

# 麹菌を用いた新規な卵発酵調味料 (たまご醤油) の調製研究

荘 咲子

2013

## 目次

はじめに	・ ・ ・ 1
第 1 章 卵液分解型たまご醬油の調製	・ ・ ・ 3
第 2 章 クラスト（ピザ）麴を用いた卵白分解型たまご醬油の調製	・ ・ ・ 20
第 3 章 卵白スポンジケーキにおける麴菌の高密度培養と卵白発酵調味料 (たまご醬油)の開発	・ ・ ・ 36
公表	・ ・ ・ 56
謝辞	・ ・ ・ 57

## はじめに

麹菌は発酵食品の製造のみならず、医薬品にも活用される安全性の高い微生物である。醤油は日本の伝統的な発酵調味料であり、日本の食文化を代表する調味料として海外でも注目されている。その製造法は大豆を窒素源、小麦を炭素源として麹菌を培養した醤油麹と食塩水を混合した「醤油もろみ」を室温で約 24 週間、発酵熟成させて製造される。熟成期間中の「もろみ」は多種多様な酵素、特にプロテアーゼにより大豆と小麦のタンパク質が分解され、多量のアミノ酸が生成し、発酵熟成に伴い耐塩性の乳酸菌や酵母が増殖すると共にアミノカルボニル反応も進み、醤油独特の風味や色が形成される。伝統的な醤油製造法は、機械化や衛生管理面での研究開発により大量製造が可能になり、大幅なコストダウンが図られた。現在、醤油麹の調製は丸大豆の代わりに大豆油製造の副産物である脱脂大豆を用いるのが一般的であり、日常的に使われている醤油の約 80% が脱脂大豆を用いて生産されている。近年、食の多様化と高級化にともない、消費者志向として通常の醤油よりも丸大豆醤油が好まれている。また、魚介類を原料とした魚醤油やカキ醤油など特徴的な風味を持つものや、色が淡いものが好まれ、味わいや料理の色を重視した調味料の需要が高まっている。さらに最近では、魚や畜肉などの動物性タンパク質を利用した発酵調味料の開発についても報告されている。しかし、通常の醤油麹に、魚や肉などの動物性食品タンパク質原料を混合し、食塩水で仕込むタンパク質分解調味液の調製方法は、種々研究され商品化もされているが、大豆や小麦以外の原料に種麹菌を直接培養し醤油化した例は極めて少ない。

一方、近年鶏卵加工業界では、卵黄の需要増加に比べて卵白の消費量は低下傾向にあり、多量の余剰卵白が冷凍保存され、その保管コストが大きな負担となっている。

鶏卵は数十種類のタンパク質を含み、栄養学的に非常にバランスの良いアミノ酸組成となっている。この鶏卵タンパク質を、醤油麹に含まれる豊富な酵素の一種であるプロテアーゼで分解することにより、多量のアミノ酸やペプチドが生成する。すなわち呈味成分の多い、従来にない風味や旨味を持つ、特徴ある発酵調味料の調製が期待できる。

なお、鶏卵は食物アレルギーの発症頻度が最も高い食品であり、小麦と同じく「特定原材料」として表示が義務化されている。しかし、醤油はその製造工程中に麹菌の多様なタンパク質分解酵素により、これらのアレルゲンが分解消長すると報告がなされている。

このような背景のもとに、本研究では余剰卵白の有効利用と高付加価値化を考慮し、

醤油麴における脱脂大豆に代わるタンパク質源として卵白を用い、麴菌を培養する糸状菌高密度培養法を検討した。また、麴に対して、食塩と卵白液を加えて、「卵白もろみ」とし、発酵熟成させる新規な卵白発酵調味液(たまご醤油)の調製法について検討を行った。

第1章では大豆と小麦を用いた通常の醤油麴に食塩と卵液(全卵, 卵黄, 卵白)と水を加え、混合した「卵もろみ」を発酵熟成させた卵液分解型のたまご醤油の調製法について検討した。第2章では、余剰卵白の有効利用と旨みの強いたまご醤油の調製を目的として、醤油麴原料の脱脂大豆の代わりに、グルタミン酸の多い小麦グルテンを用い、小麦粉(強力粉)、酵母等と捏ねて薄く延ばし、焼成したピザ台クラストを固体培地として麴菌を培養し、得られたクラスト麴に卵白液と食塩を加え、卵白もろみとして発酵熟成させる(クラストたまご醤油)の調製法について検討した。本研究では「卵白もろみ」の発酵熟成中における卵タンパク質の消失についても検討した。第3章では、卵白の起泡性や泡沫安定性に着目し、麴の調製段階から大豆の代わりに卵白を利用したところ、卵白液と強力粉にベーキングパウダーを加えて焼成したスポンジケーキを固体培地として麴菌を培養する糸状菌高密度培養法を考案した。さらに、得られた「スポンジケーキ麴」に食塩と卵白液を加えて「卵白もろみ」とし、これを発酵熟成させる新規な卵白発酵調味液(たまご醤油)を調製して評価した。

本研究では「卵白もろみ」の発酵熟成中における卵タンパク質の消失についても検討した。

## 第 1 章 卵液分解型たまご醬油の調製

## 第1章 卵液分解型たまご醤油の調製

日本の鶏卵生産量は、農林水産省の鶏卵流通統計によると1993年には年間260万t近くに達し、近年では250万t前後で推移している。また、鶏卵消費量は国民一人当たり19.5kg、殻つき卵に換算して約330個と世界一である。その内訳は、約53%がパック卵として家庭内での調理等に利用され、約24%が加工用、約23%が外食産業や業務用として消費されている。

また、鶏卵はその成分が抽出・精製され、それらの栄養機能や生理機能のみならず、保健機能を有する健康機能食品としての応用が注目されている。これら鶏卵成分のなかで、卵黄リン脂質に含まれるホスファチジルコリンの認知症の改善効果や、アラキドン酸が乳幼児の脳や網膜の発達に対し重要な働きを果たすとして、その高付加価値利用が実用化されている。その一例として、卵黄を利用して、アラキドン酸とドコサヘキサエン酸を母乳に近いバランスで添加した育児ミルクが製造されている<sup>1)2)3)</sup>。

従来、加工卵では卵黄の需要が多く、マヨネーズや洋菓子やリン脂質の抽出原料等に使用され、その消費量は近年増加傾向にある。それに対し、卵白の消費量は低下傾向にあり、現在多量の余剰卵白が冷凍保存されている。その維持費は鶏卵加工業者の大きな負担であり、新しい用途の開発が望まれている。

醤油は大量生産が可能で、日常的に使用されている伝統的調味料である。通常、脱脂大豆タンパク質を窒素源、割砕小麦を炭素源として、麹菌を培養した醤油麹に、食塩水を添加した「もろみ」を約6ヶ月間発酵熟成させて製造される。近年、食の多様化にともない、醤油以外の特徴を持った高品質な調味料への関心が高まっている。鶏卵は数十種類のタンパク質を含み、栄養学的に非常にバランスの良いアミノ酸組成となっている。全卵に約13%、卵白に約10%、卵黄に約17%含まれるタンパク質を<sup>4)5)</sup>、醤油麹に含まれる豊富な酵素の一種であるプロテアーゼで分解することにより多量のアミノ酸やペプチドが生成する。すなわち呈味成分の多い、従来にない風味や旨味を持つ、特徴ある発酵調味料の調製が期待できる。

このような背景のもとに、本研究では余剰卵白の有効利用および高付加価値化を考慮し、通常の醤油麹に食塩と卵液(全卵、卵黄、卵白)と水を加え、もろみとして発酵熟成させた新規発酵調味液(卵白分解型たまご醤油)の開発を目的とし、その調製法について検討した。

## 第 1 節 実験方法

### 1 . 実験材料

醤油麹は、京都府醤油醸造協業組合から提供していただいた。脱脂大豆を窒素源、割砕小麦を炭素源とし、*Aspergillus Oryzae* を培養した一般的な醤油麹を用いた。

鶏卵は(株)ナカデ鶏卵(京都府宇治市)より提供していただいた L~LL 白玉を用いた。

### 2 . 醤油麹の中性プロテアーゼ活性測定

醤油麹の中性プロテアーゼ活性測定は、国税庁所定分析法<sup>6)</sup>に準じ、カゼインを基質として pH6.0 で測定した。

### 3 . 醤油もろみの調製

各醤油もろみの配合と組成を表 1 に示す。対照醤油は水、各たまご醤油は卵白液、卵黄液、全卵液および水を用いて塩分濃度を約 16%，タンパク質濃度を約 13%に調製した。醤油麹 4.0kg，食塩 2.67kg に対し，卵白醤油は卵白液 10.0kg，卵黄醤油は卵黄液 6.25kg と水 3.75kg，全卵醤油は全卵液 7.69kg と水 2.31kg を配合し，全量を 16.67 kg とした。対照.醤油は 4.0kg の醤油麹に食塩 1.42kg と水 3.5kg を配合し，全量を 8.92 kg とした。

各々 1 週間に 1 回，醤油もろみを均一に攪拌し，経時的にサンプリングを行いながら室温で 6 ヶ月間発酵熟成させた。

### 4 . 醤油もろみ上清の分析・測定方法

#### 1) 試料の調製方法

熟成中の醤油もろみを 0 日目，1，2，3，4，6 週目，2，3，4，5，6 ヶ月目に，それぞれ約 100g サンプリングし，ガーゼで搾り，液成分を採取した。不純物を除去するため，液成分約 50ml を(株)トミー精工製遠心分離機 Suprema21 を用いて，12,000rpm×20 分，20℃で遠心分離した。卵黄醤油の液成分は粘性が高かったので水で 2 倍希釈後，遠心分離した。卵黄醤油と全卵醤油の液成分は，一度遠心分離した後，上部に出た脂質の固まりを除去し，再び 12,000rpm×20 分，20℃で遠心分離した。これらの上清を濾紙 NO.2（アドバンティック東洋）で自然濾過し，もろみ上清試料とした。対照醤油は自然濾過が困難であったため，吸引濾過を行った。

## 2) 窒素の定量

全窒素の定量はケルダール分解法<sup>7)</sup>，ホルモール態窒素はしょうゆ試験法<sup>8)</sup>に基づいて行った。

ペプチド鎖平均鎖長は各もろみ上清試料中の全窒素量（TN）およびホルモール態窒素量（FN）から，TN/FN で算出した。

## 3) pH の測定

新電元工業(株) 製 pH メーターPH BOY-KS723 を用いて測定した。

## 4) 色調

吸光度は醤油の色調を単一波長で測定する場合，一般的に使用される赤色系の 550nm で(株)島津製作所製 PharmaSpec UV-1700 を用いて測定した。試料の濃度は，吸光度が 1.2 以下になるように脱イオン水を用いて希釈した。

## 5) アミノ酸分析

もろみ上清試料 0.5ml を 5 分間ボイルした後，久保田商事(株) 製遠心分離器 KUBOTA1120 を用いて 14,000rpm×5 分間遠心分離した上清 10  $\mu$ l を，クエン酸三ナトリウム緩衝液（pH2.2）で 100 倍に希釈した。希釈液を再び 14,000rpm×5 分間遠心分離した上清 200  $\mu$ l を，(株)島津製作所製高速液体クロマトグラフ Prominence を用いて分析した。

# 第 3 節 結果

## 1 . 醤油麴の中性プロテアーゼ活性測定

醤油麴の中性プロテアーゼ活性醤油麴の中性プロテアーゼ活性は 20586U／g であった。

## 2 . もろみの発酵熟成状態

6 ヶ月間発酵熟成させた対照醤油は，もろみ表面に清澄な液が浸出したが，粘性が高く，濾過が困難であった。卵白醤油は，液化が進み，濾過適性に最も優れていた。全卵醤油は，卵白醤油に比べて粘性が高いものの，液化が進み，濾過適性に優れていた。卵



黄醬油は液化が進まず、粘性が高いため、濾過適性が著しく劣った。

### 3．窒素の定量

#### 1) 全窒素量

対照醬油は仕込み当初、可溶化窒素が 0.48%，各種たまご醬油は、卵黄醬油、全卵醬油が約 1.5%，卵白醬油が約 1.77%であった（図 1）。

6ヶ月目で卵白醬油、全卵醬油、対照醬油は、約 2%まで分解が進んだが、卵黄醬油は 1.73%と分解が進まなかった。

#### 2) ホルモール態窒素量

仕込み当初は、全ての醬油が約 0.2%程度を示したが、熟成の進行にともない増加した。熟成 6ヶ月目で、卵白、全卵、対照の各醬油は、約 1%まで増加したが、卵黄醬油は 0.74%となった（図 2）。

#### 3) ペプチド鎖平均鎖長

熟成前の対照醬油は約 3，各卵醬油は卵黄醬油が約 6，卵白醬油、全卵醬油が約 10であった。6ヶ月目には全ての醬油が平均鎖長約 2まで分解された（図 3）。

### 4．pH の変化

各種たまご醬油に使用した鶏卵の pH は、卵白液 9.2，卵黄液 6.1，全卵液 7.6 であった。醬油麴に食塩水を添加した、熟成前の対照醬油の pH は 5.3，また、卵液及び水を醬油麴に添加した卵白醬油は 6.6，卵黄醬油が 5.8，全卵醬油が 5.4 を示した。卵白醬油は、卵白がアルカリ性を示すため、熟成前には他の醬油に比べ高い値を示した。通常、もろみの pH は熟成中の乳酸菌増殖にともない低下し、4.7～4.8 となる。全ての醬油 pH は、熟成期間が進むにつれて低下し、6ヶ月間の熟成期間中にいずれも 5.0 付近まで低下した（図 4）。

### 5．色調の変化

各種醬油の色調を目視により評価すると、明らかに対照醬油が濃く、卵白醬油が薄いことが認められた。また、熟成期間 6ヶ月目の波長 550nm における吸光度は卵白醬油 2.02，卵黄醬油 3.48，全卵醬油 2.48，対照醬油 11.60 と卵白醬油の色調が顕著に薄か

った（写真 1）。

## 6. アミノ酸分析

### 1) アミノ酸総量の変化

仕込み当初、全ての醤油はアミノ酸総量約 1%と低値を示すが、卵白、全卵、対照の各醤油は熟成と共に増加し、6 ヶ月目には卵白醤油 10.%, 卵黄醤油 3.6%, 全卵醤油 10.0%, 対照醤油が 10.12%となった（図 5）。

### 2) 各種アミノ酸含量

旨味に関するアスパラギン酸は、対照醤油で約 2.7%と高値を示した。アスパラギン酸より強い旨味を持つグルタミン酸の濃度は、対照醤油の約 1.6%に対し、卵白醤油約 1.7%と、やや高くなった。

甘味に関するグリシン、アラニン、苦味とコクに関するバリン、ロイシン、リジンは、卵白醤油と全卵醤油でやや高値を示した（図 6）。

## 第 4 節 考察

醤油の醸造には麹菌が産生する多種多量の酵素が原料の分解に対して重要な役割を果たす。特に醤油麹に含まれるプロテアーゼは 20 種類以上に及び、その基質特異性や最適作用条件は各々異なっている。このため多種類のペプチド結合を分解することが可能で、高分子のタンパク質を分解、可溶化するのに極めて有効である<sup>9)</sup>。

対照醤油のもろみ上清試料中の全窒素量は、仕込み当初、低値を示したが、醤油麹中のタンパク質が経時的に酵素分解されて可溶化するため、熟成の進行にともない徐々に高くなった。各種たまご醤油の全窒素量は、熟成前から高い値を示す。これは醤油麹に添加した鶏卵中のタンパク質が水溶性であり、仕込み当初からもろみ上清中に回収され、全窒素量が高いためである。

対照醤油、卵白醤油、全卵醤油は6 ヶ月間で分解が進んだが、卵黄醤油は分解が進まなかった。また、ホルモール態窒素量は、全ての醤油で熟成の進行と共に増加するが、熟成6 ヶ月目では、卵白、全卵、対照の各醤油に対し、卵黄醤油の増加が劣る。ペプチド鎖平均鎖長は、熟成前の対照醤油は約 3、各卵醤油は卵黄醤油が 6 程度、卵白醤油、全卵醤油が約 10 を示した。これは醤油麹に添加した卵白や全卵中に水溶性のたん白質

が多く含まれているためである。熟成6ヶ月目には全ての醤油が平均鎖長約2まで分解された。また、アミノ酸総量は仕込み当初、全ての醤油が約1%と低い値を示したが、卵白、全卵、対照の各醤油は熟成と共に増加した。卵白醤油、全卵醤油は、対照醤油と同等までタンパク質がアミノ酸に分解され、可溶化したことを示したが、卵黄醤油は分解が進まず可溶化に至らなかった。卵黄に含まれる約17%のタンパク質のうち、約60%は脂質と結合したリポタンパク質として存在し、残りは水溶性タンパク質である。また、脂質含量は約30%で、主にリポタンパク質として存在している。第五訂日本食品成分表記載の鶏卵の脂質量より、各種たまご醤油もろみ中の鶏卵由来の脂質量を算出すると、卵黄醤油約12.6%、全卵醤油約4.8%、卵白醤油は0%であった。卵黄醤油諸味中には高濃度の鶏卵由来の脂質が存在し、その多くがタンパク質と結合した状態であるため、醤油麴中のプロテアーゼによる卵黄タンパク質の分解が阻害されるとともに、醤油麴中のタンパク質の分解をも阻害していると推測される。

各種アミノ酸含量は、旨味に関するアスパラギン酸が対照醤油で高い値を示したが、アスパラギン酸より強い旨味を持つグルタミン酸の濃度は、対照醤油に対し、卵白醤油がやや高い。甘味に関するグリシン、アラニン、苦味とコクに関するバリン、ロイシン、リジンは、卵白醤油と全卵醤油でやや高い値を示した。この結果より、卵白を含む、卵白醤油および全卵醤油は対照醤油とは異なった、特徴ある風味を持つと考えられる。醤油の色はメイラード反応による非酵素的褐変と、チロシナーゼなどによる酵素的褐変で生成されるメラノイジンに起因する。醤油の着色は主にメイラード反応により起こるが、アミノ酸に反応する糖の量と種類に左右される。特にペントースはヘキソースに比べ、不安定なため褐変しやすい<sup>10)11)12)</sup>。

第五訂日本食品成分表記載の、脱脂大豆と鶏卵の糖含量より算出した各種醤油の糖質配合比率は、卵白醤油13.0%、卵黄醤油12.8%、全卵醤油12.9%、対照醤油23.8%となる。この糖含量の違いによりメイラード反応の進行が異なるため、対照醤油の色調が濃く、卵白醤油が顕著に薄くなったと推測される。

本研究では、卵黄の分解性に課題を残したものの、卵白液や全卵液を用いることにより、従来の醤油麴のみを使用した対照醤油に対し、もろみの量を約2倍に増量した配合においても同等の旨味をもつ醤油が得られた。特に卵白醤油はアミノ酸総量が高く、強い旨味や甘味を持ち、色調が顕著に薄く、調味料として付加価値の高いものが得られた。このことより、卵白液を用いたたまご醤油は、余剰卵白液の有効利用および高付加価値化に寄与すると共に、食の多様化により求められる、新規性のある発酵調味料としての

利用が期待できる。

## 第5節 要約

卵白液や全卵液を用いた醤油は、従来の醤油麹のみを使用した対照醤油に対し、もろみの量を約2倍に増量しても同等の旨味をもつ醤油が得られた。

卵白液を含む醤油のホルモール態窒素量は約1.0%まで増加した。また、ペプチド鎖平均鎖長は、熟成前は約10で、熟成とともに約2まで分解された。

発酵熟成中、鶏卵のタンパク質が醤油麹のプロテアーゼにより分解された結果、熟成期間6ヶ月目の卵白を含む醤油のアミノ酸総量は、約10%と対照醤油と同等の値を示した。卵白醤油はアミノ酸総量が高く、旨味や甘味の強い醤油となった。また、熟成期間6ヶ月目の波長550nmにおける吸光度は卵白醤油の色調が顕著に薄かった。以上の結果、卵白を用いたたまご醤油は経済的にも優れ、独特の風味と薄い色調を持ち合わせた、新規の発酵調味料としての利用が期待できる。

## 引用文献

- 1) 渡邊乾二 編，食卵の科学と機能－発展的利用とその課題－，アイ・ケイコーポレーション，(2008)
- 2) 八田一ら，化学と生物，401，277，(1997)
- 3) 八田一，F F I ジャーナル，211，905-917，(2006)
- 4) 宮本武明，赤池敏宏，西成勝好 編，21世紀の天然生体高分子材料，235-237，(1998)
- 5) 中村良 編，卵の科学，(株)朝倉書店，(1998)
- 6) 注解編集委員会 編，第四回改正 国税庁所定分析法注解，(財)日本醸造協会，211-226 (1993)
- 7) 日本薬学会 編，衛生試験法・注解 2005，173－175，(2005)
- 8) しょうゆ試験法編集委員 編，しょうゆ試験法，財団法人 日本醤油研究所，19，(1985)
- 9) 枅倉辰六郎 編，増補 醤油の科学と技術，(財)日本醸造協会，171-181，(1994)
- 10) 枅倉辰六郎 編，増補 醤油の科学と技術，(財)日本醸造協会，294-304，(1994)
- 11) 四方日出男，醸協，75，149-55，(1980)
- 12) 加藤博通，醸協，61，766-771，(1966)

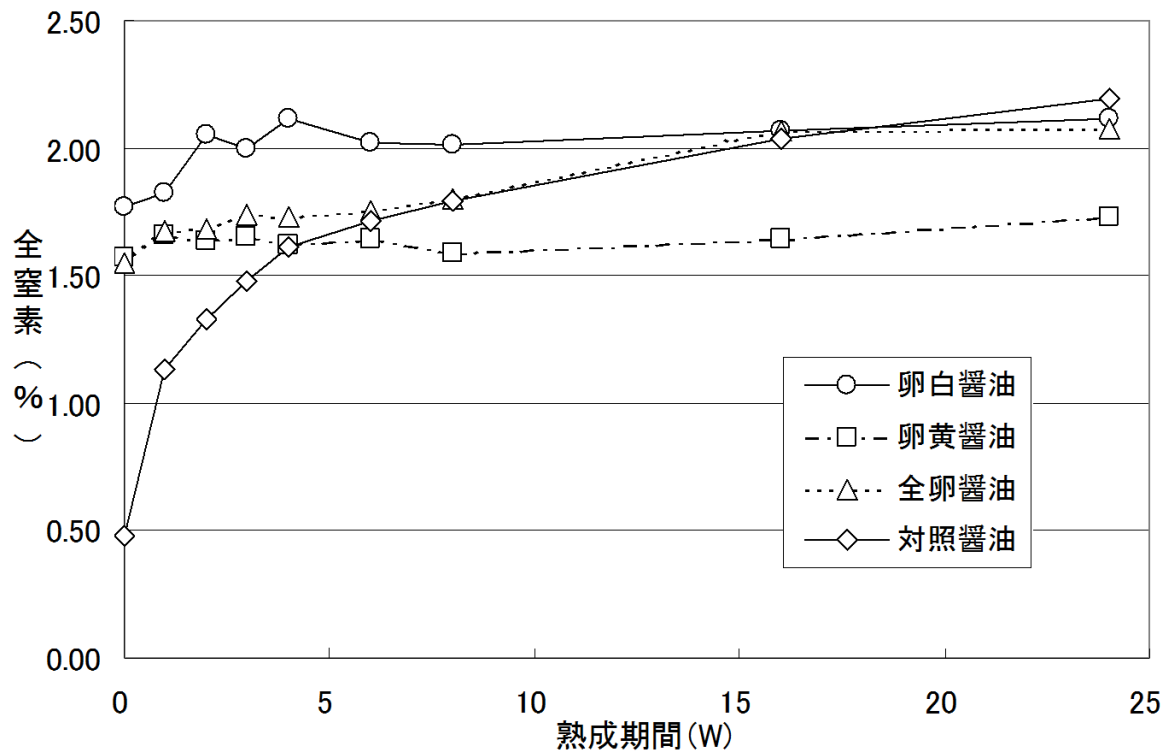


図1 もろみ上清中の全窒素量の経時変化

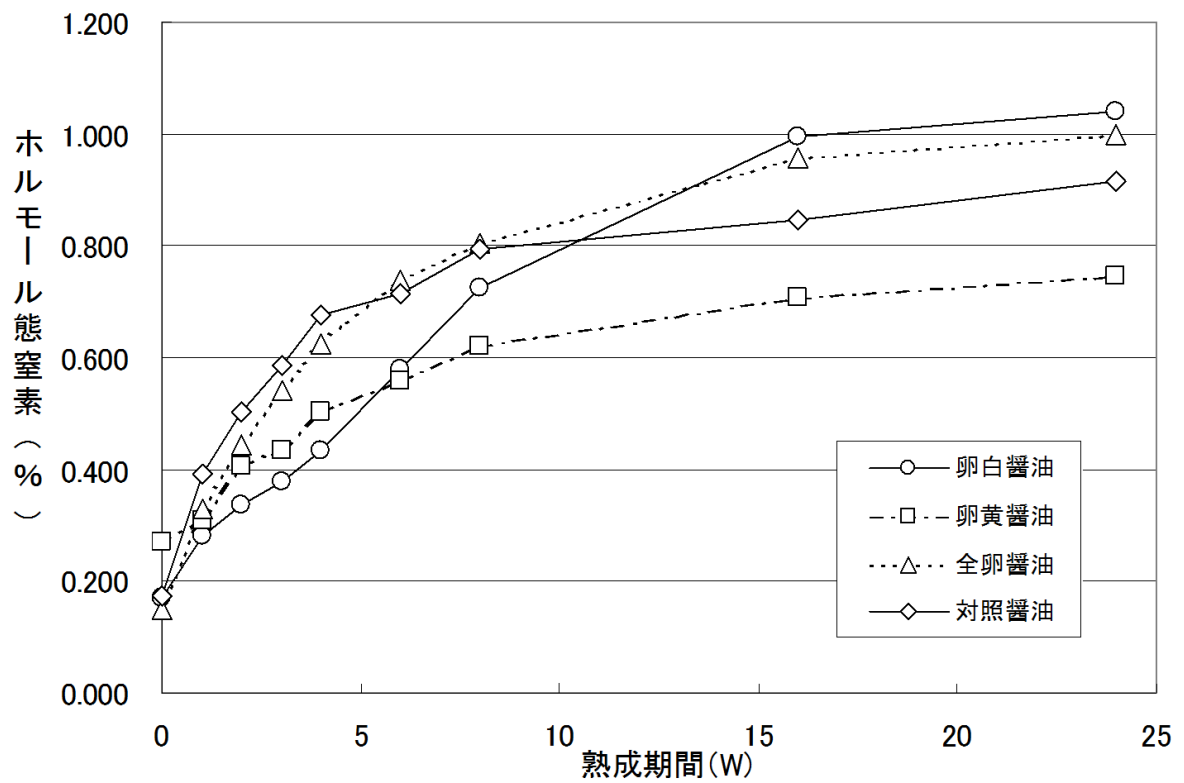


図2 もろみ上清中のホルモール態窒素量の経時変化

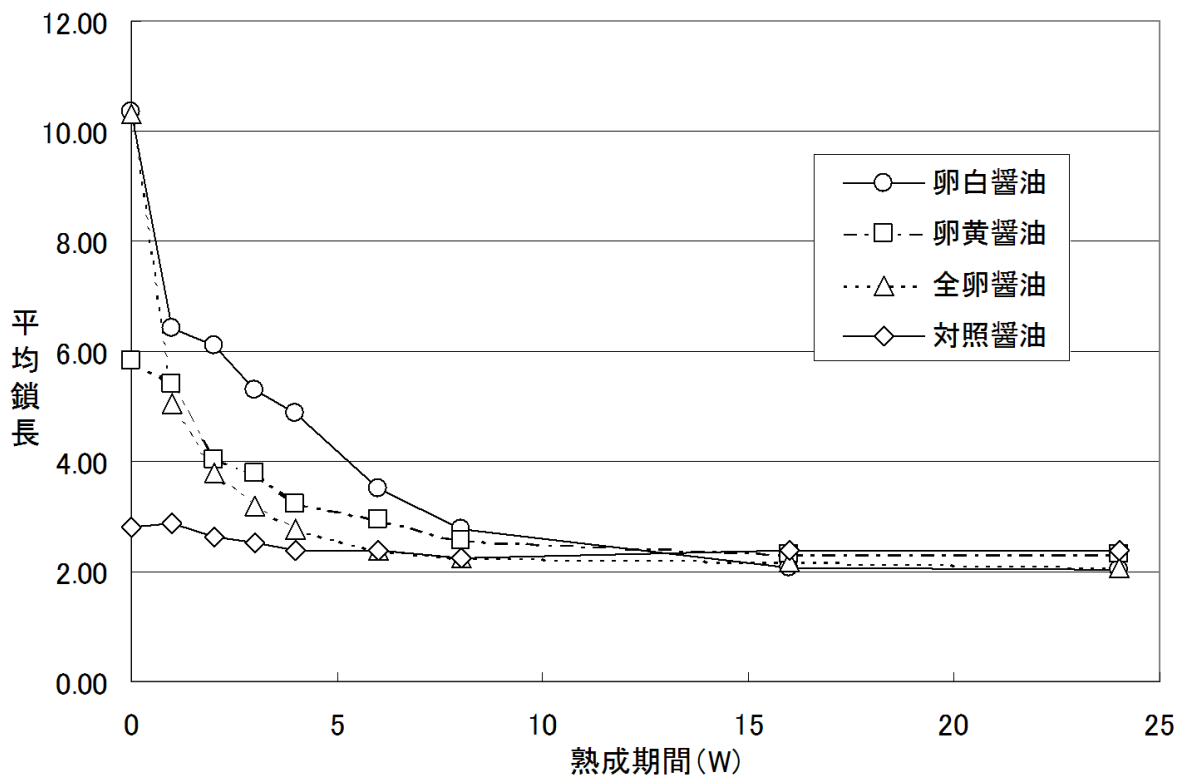


図 3 もろみ上清中のペプチド鎖平均鎖長経時変化

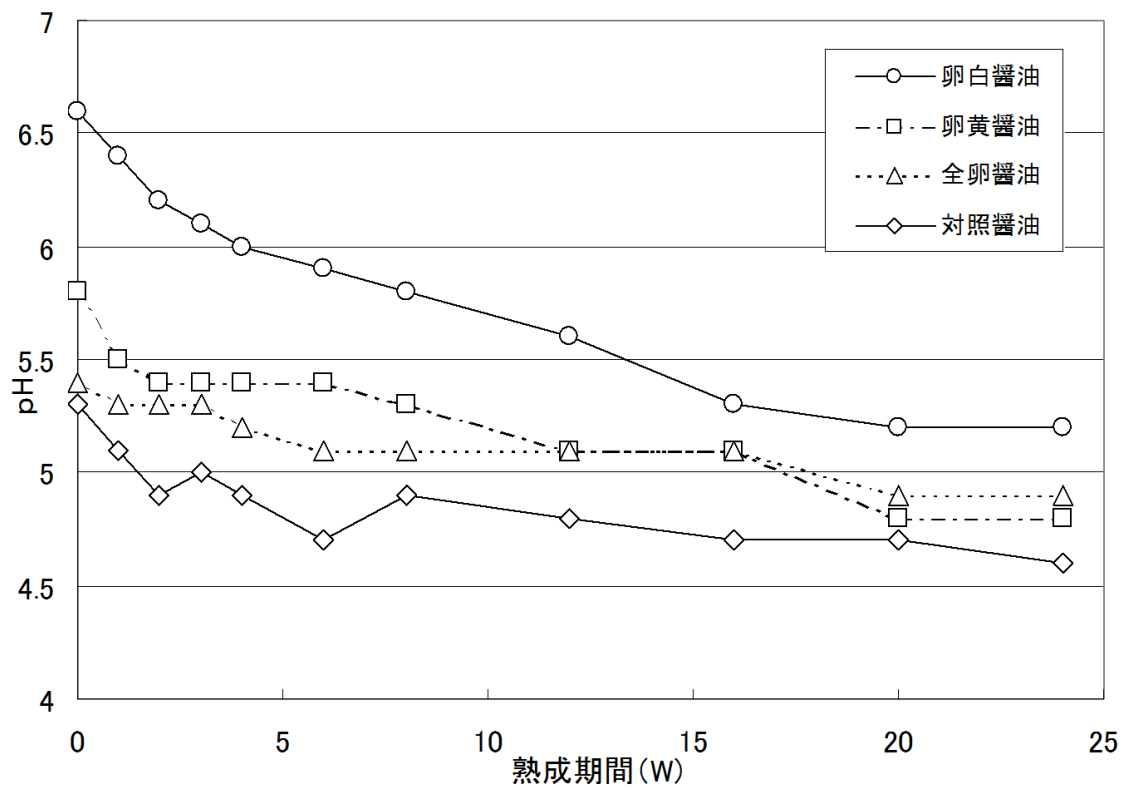


図 4 もろみ上清中の pH の経時変化

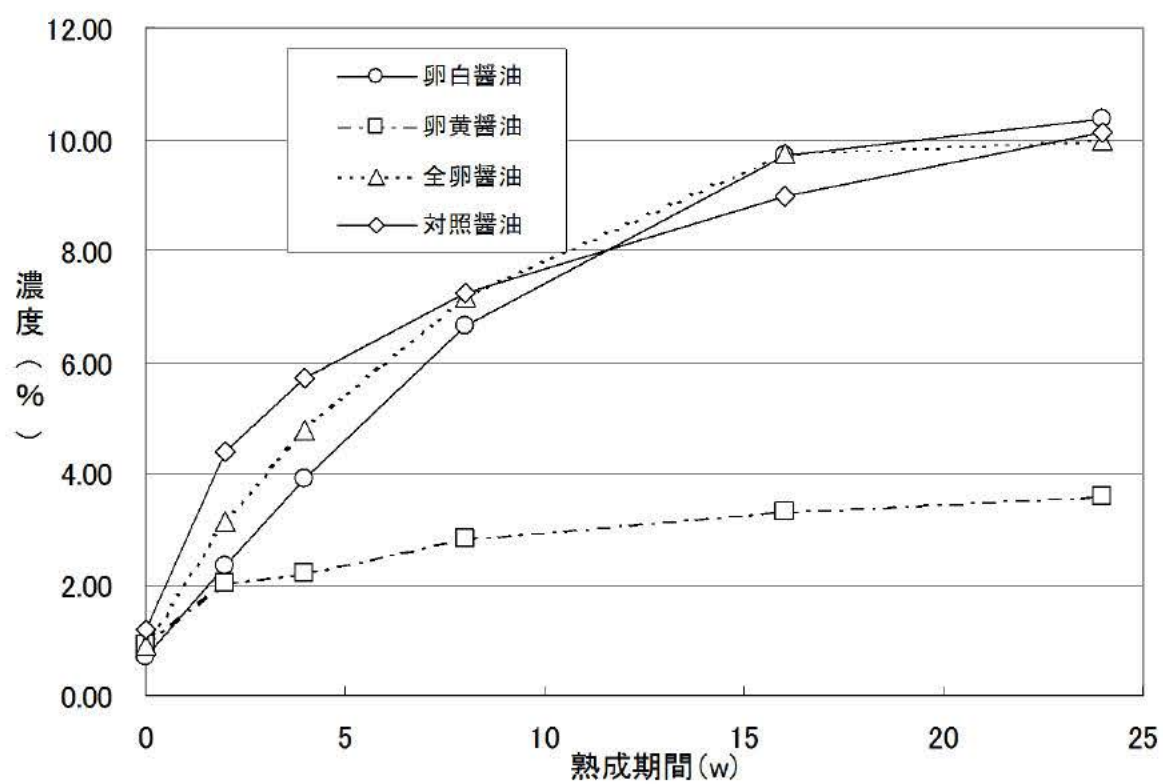


図5 もろみ上清中のアミノ酸総量の経時変化

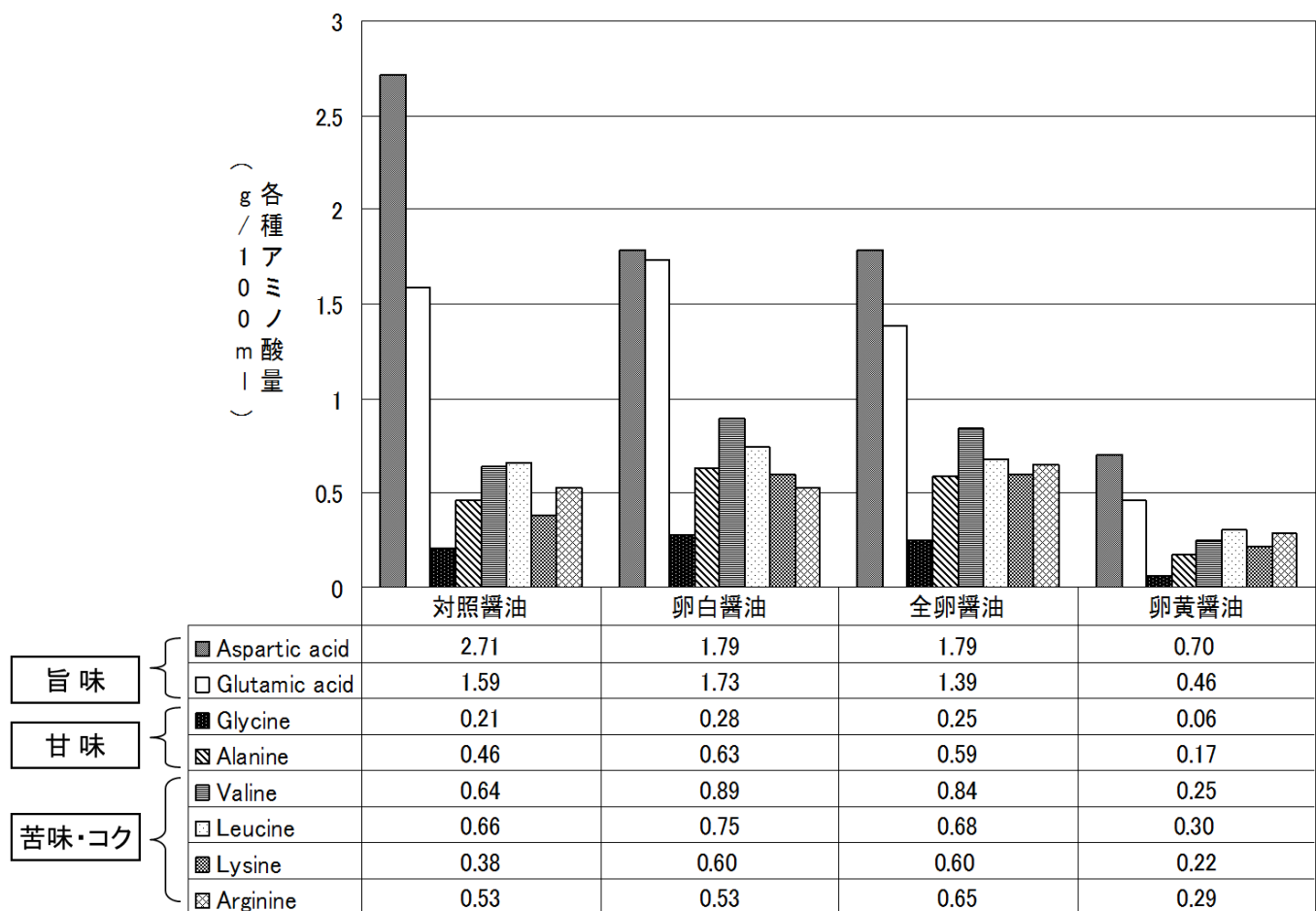


図 6 もろみ上清中のアミノ酸組成の比較



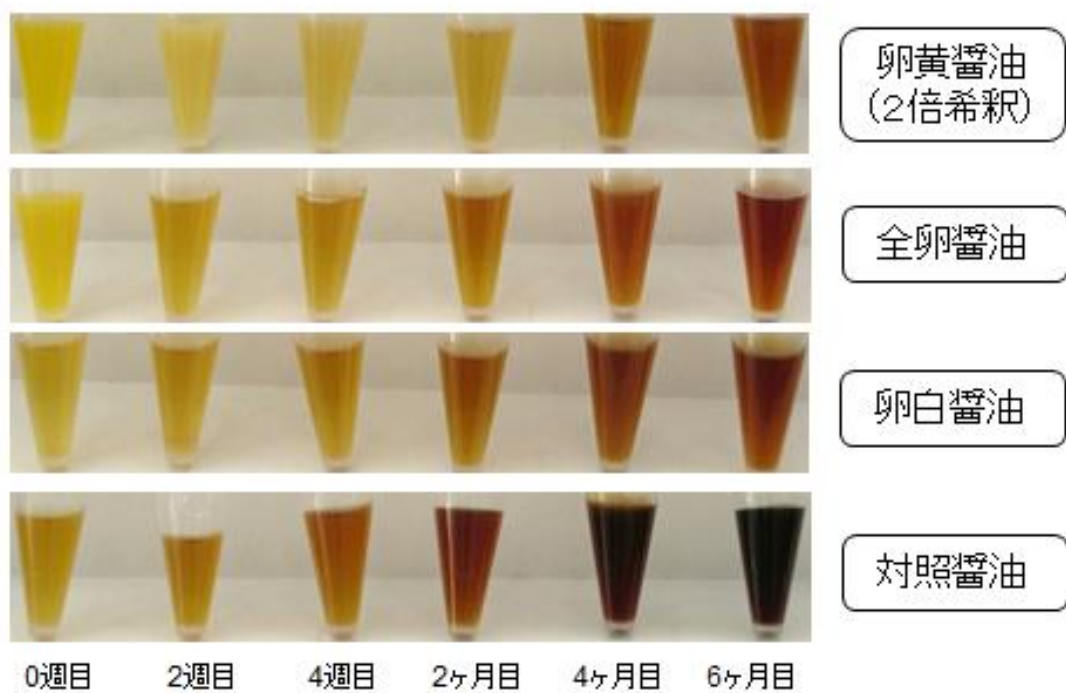


写真 1 各種醤油の色調変化

表1.もろみの配合と組成

	醤油麹 (kg)	鶏卵(kg)			食 塩 (kg)	水 (kg)	合計 (kg)	水分含量 (%)	塩分含量 (%)	蛋白質含量 (%)
		卵白液	卵黄液	全卵液						
対照醤油	4.0				1.42	3.50	8.92	44.2	15.8	12.5
卵白醤油	4.0	10.0			2.67		16.67	55.7	16.1	13.0
卵黄醤油	4.0		6.25		2.67	3.75	16.67	43.2	16.1	13.0
全卵醤油	4.0			7.69	2.67	2.31	16.67	51.6	16.0	12.4

## 第2章 クラスト（ピザ）麴を用いた卵白分解型たまご醤油の調製

## 第2章 クラスト（ピザ）麴を用いた卵白分解型たまご醤油の調製

醤油は日本の伝統的な発酵調味料である。その製造法は大豆を窒素源、小麦を炭素源として麴菌を培養し、得られた醤油麴と食塩水を混合した「もろみ」を室温で約6ヶ月間、発酵熟成して得られる。発酵熟成期間中の「もろみ」は、高濃度の食塩で防腐されながら、大豆と小麦のタンパク質が麴菌のプロテアーゼで分解され、液化して醤油に変わる。また、発酵熟成に伴い、耐塩性の乳酸菌や酵母が増殖し、アミノカルボニル反応も進み、醤油独特の風味や色が形成される<sup>1)</sup>。

本来、醤油の原料は大豆と小麦であるが、近年は大豆の代わりに脱脂大豆を用いるのが一般的である。食品業界では、大豆油の需要増加に伴い、その抽出残渣（脱脂大豆）が大量に残るが、それを有効利用し、醤油が大量に製造されている。すなわち、日常的に使われている醤油のほとんどは、脱脂大豆を用いて生産されたもので、従来大豆を用いた丸大豆醤油より安価であるが、旨みやコク味などの風味や品質面で劣る。近年、食の多様化と高級化に伴い、消費者志向としては、通常の醤油よりもコクや風味の強い丸大豆醤油が好まれる。また、丸大豆醤油以外にも魚介類を原料とした魚醤やカキ醤油など、風味が特徴的な調味料の需要が高まっている。我々は、通常の醤油麴に卵白液と食塩を混合した「卵もろみ」を発酵熟成させ、卵風味の調味液「たまご醤油」を開発した。すなわち、卵白液に約10%含まれるタンパク質を、麴菌が産生するプロテアーゼやグルタミナーゼで分解することにより、多量のアミノ酸やペプチドを生成させ、呈味成分の多い、従来にない風味や旨味を有する卵風味の調味液を調製した<sup>2)</sup>。

近年、日本の鶏卵生産量は250万t前後で推移している。2010年では252万t、国民一人当たりの鶏卵消費量は、殻つき卵に換算して324個と世界二位であった。その内訳は、51.3%がパック卵として家庭で利用され、48.7%が加工用および外食産業や業務用として消費されている<sup>3)4)</sup>。従来、加工卵としては卵黄の需要が多く、マヨネーズや洋菓子に使用され、その消費量は増加傾向にある。一方、水産練り製品の需要低迷に伴い、卵白の消費量は低下傾向にあり、現在、多量の余剰卵白が冷凍保存されている。その冷凍保存コストは鶏卵加工業者の大きな負担であり、卵白の新しい用途の開発が望まれている。

本研究では、余剰卵白の有効利用と旨みの強いたまご醤油の調製を目的として、まず醤油麴原料の脱脂大豆の代わりに、グルタミン酸の多い小麦グルテンを用い、小麦粉（強力粉）、酵母等と捏ねてピザ台用生地を調製した。それを薄く延ばして焼成したピザ台

クラストを固体培地として麹菌を培養し、得られたクラスト麹に卵白液と食塩を加え、卵白もろみとして発酵熟成させる新規な発酵調味液（たまご醤油）の調製法について検討した。

## 第1節 実験方法

### 1. 実験材料

小麦粉は昭和産業株式会社製の強力粉（キングスター）、活性グルテンはグリコ栄養食品株式会社製の粉末状小麦たん白（A-グル GB）、不活性グルテンは長田産業株式会社製（干麩不活性グルテン）、酵母はキリン共和発酵株式会社製（ダイヤイースト）、ベーキングパウダーはオリエンタル酵母株式会社製のものをを用いた。醤油麹用の種麹 *Aspergillus oryzae* HO-117 は株式会社菱六より、卵白液は三州食品株式会社の殺菌卵白液を提供していただいた。脱脂大豆と割砕小麦で調製した通常の醤油麹は京都府醤油協業組合から提供していただいた。市販の醤油はキッコーマン株式会社製の濃口醤油を購入し、アミノ酸分析や官能評価の対照醤油として用いた。

### 2. クラスト麹の調製

強力小麦粉 750g、活性グルテン 150g、不活性グルテン 100g、酵母 20g、ベーキングパウダー25g、食塩 20g、約 35℃の温湯 700ml の割合でピザ台用生地を混捏した後、29℃、湿度 87%で 60 分間発酵させた。発酵した生地を再度捏ねてガス抜きをした後、さらに二次発酵（29℃、湿度 87%、30 分間）させた。このように調製した生地を厚さ約 5 mmに延ばし、270℃で 1 分 10 秒間焼成して放冷後、フードカッターで約 5mm 角に粗砕して麹を培養するクラスト個体培地を得た。このクラスト個体培地を 20 kg調製し、水分 45%に調湿後、耐熱性袋に詰め、120℃で 25 分間オートクレーブし、次いで種麹 (*Aspergillus oryzae* HO-117) を 30g 接種した。木製麹蓋(250×450×50mm)に盛り込み、電気定温恒温器(有限会社芦田器械店製 AM-180 型)で、30～33℃、湿度 95%以上の環境で 70 時間、麹菌の培養を行った。

### 3. 酵素活性の測定

酵素活性測定に用いる麹の抽出液は国税庁所定分析法<sup>5)</sup>に従い調製した。すなわち、クラスト麹 10 g または通常の醤油麹 10 g に M/100 酢酸緩衝液 (pH5.0) 100m l を加

え、ホモジナイザー（ポリトロン，PT2100S）で 10,000rpm×2 分間攪拌した後，No.2 濾紙（アドバンテック東洋）で自然濾過した抽出液を 1 晩，M/100 酢酸緩衝液（pH5.0）に対して透析した。透析した抽出液を適宜希釈し，国税庁所定分析法<sup>5)</sup>に準じて中性プロテアーゼ，酸性プロテアーゼ，酸性化カルボキシペプチダーゼ， $\alpha$ —アミラーゼ，グルコアミラーゼの各活性を測定した。また，グルタミナーゼ活性は，しょうゆ試験法<sup>6)</sup>に準じ，ヤマサ L-グルタミン酸測定キット（ヤマサ醤油株式会社製）を用いて各サンプルごとに 3 回ずつ測定した。

#### 4．卵白もろみの調製と醤油化

クラスト麴 9.05 kg，水 2.95 kg，卵白液 50.0 kg，食塩 11.8 kg，総重量 73.8 kg を 70L 容量のプラスチックバケツ内で混合し，塩分 16% の卵白もろみを調製し，室温（約 15~25℃）で 6 ヶ月間発酵熟成させた。その間，初めの 1 週間は毎日 1 回，その後は 1 週間に 1 回，もろみを攪拌して均質化し，経時的にサンプリングを行った。6 カ月発酵熟成させた卵白もろみは，広島県の岡本醤油醸造所に依頼し，実際に醤油もろみをしぼる濾布を用いて濾過した。得られたろ液を火入れ殺菌（80℃，30 分間）した後，冷蔵庫で 3 日間滓引きして，その上澄みを 100mL 容量のペットボトルへ充填した。そして，試供品ラベル（図 1）を貼り，たまご醤油の試作品を調製した。

#### 5．卵白もろみ上清の分析方法

##### 1) 試料の調製方法

熟成期間中の卵白もろみから，0 日目，1，2，3，4，6 週目，2，3，4，5，6 ヶ月目に，それぞれ約 100g ずつサンプリングし，ガーゼで搾り，液画分を採取した。不純物を除去するため，液画分の約 50ml を 12,000rpm×20 分，20℃で遠心分離（株式会社 楸トミー精工製，Suprema21）した。得られた遠心上清を濾紙 NO.2（アドバンテック東洋）で自然濾過し，その濾液を卵白もろみ上清試料とした。

##### 2) 窒素の定量

全窒素の定量はケルダール分解法<sup>7)</sup>，ホルモール態窒素はしょうゆ試験法<sup>6)</sup>に基づいて行った。全窒素の定量は各サンプルごとに 3 回ずつ測定した。ペプチド鎖平均鎖長は，各もろみ上清試料中の全窒素量 TN（W/V%）およびホルモール態窒素量 FN（W/V%）から，TN/FN で算出した。

6ヶ月熟成後のもろみ上清のタンパク質量は、全窒素量に対して原材料の配合比率に応じ、それぞれのタンパク質換算係数（小麦 5.83，鶏卵 6.25）を乗じて算出した。

### 3) pH の測定

pH メーター（新電元工業(株) 製，PH BOY-KS723）を用いて測定した。

### 4) 色調

同時測光方式分光式色差計（(株) 日本電色工業製，SQ200）を用いて  $L^*a^*b^*$  値を測定し、醤油の彩度および色相とした。

### 5) アミノ酸分析

もろみ上清試料 0.5ml を 5 分間煮沸した後，遠心分離機（久保田商事（株）製，KUBOTA1120）を用いて 14,000rpm×5 分間遠心分離した上清を，400ml の蒸留水にクエン酸三ナトリウム 9.8g，過塩素酸 8ml，*n*-カプリル酸 0.05ml を加え，500ml にメスアップ後，過塩素酸で pH 2.2 に調整したクエン酸三ナトリウム緩衝液（pH2.2）で 100 倍希釈した。希釈液を再び 14,000rpm×5 分間，遠心分離した上清を(株) 島津製作所製高速液体クロマトグラフ Prominence を用いて，以下の条件でアミノ酸分析を行った。使用カラムは強酸性陽イオン交換樹脂カラム（Shim-pack Amino-Na 型），試料液量は 10  $\mu$ l，検出はポストカラム法で反応試薬（*o*-フタルアルデヒド）を用いて蛍光検出（Ex = 348 nm, Em = 450 nm）を行った。

### 6) 水分量の測定

火入れ殺菌後のたまご醤油の試作品 5g を試料として，赤外線水分計（(株) ケット科学研究所製，F-1 型）を用い，120℃，20 分間乾燥させて測定した。

### 7) 塩分の定量

6ヶ月熟成後のもろみ，および火入れ殺菌後のたまご醤油の試作品 10g を蒸留水で 500ml に希釈した試料 10ml を用い，各サンプルごとに 3 回ずつ，モール法で測定した。

### 8) 卵白タンパク質の定量

卵白もろみの熟成前と 6ヶ月熟成後のもろみ上清，および最終の火入れ殺菌後のたま

ご醤油の試作品を試料として、卵白アレルゲンモリナガ FASPEK 卵測定キット（卵白アルブミン）（(株) 森永生科学研究所製）を用い、その操作マニュアルに従い、サンドイッチ ELISA 法で卵総タンパク質の定量を行った。

## 9) 官能検査

最終の火入れ殺菌後のたまご醤油の試作品およびキッコーマン株式会社製の濃口醤油を約 70℃の温湯で 20 倍希釈した液 30ml を試料とし、官能検査をおこなった。

パネラー28名（22～55歳：女性）に対し7項目 ①旨味が強い、②甘みを感じる、③卵の味を感じる、④大豆の味を感じる、⑤風味がよい、⑥色が薄い、⑦おいしい(総合評価) について2点嗜好試験を行った<sup>8)</sup>。なお、期待効果により判断が左右されないよう、評価用紙に、試料内容の情報は記載しなかった。試験結果は二項検定により検討した。

## 第2節 結果

### 1. クラスト麴および醤油麴の酵素活性

クラスト麴の中性プロテアーゼ活性は 63,600U/g, 醤油麴は 30,000U/g であった。また、クラスト麴のグルタミナーゼ活性 64.7 U/g, 醤油麴は 36.6 U/g であった(表1)。

### 2. 卵白もろみの発酵熟成状態

仕込み当初、もろみ表面に麴が浮上していたが、熟成とともに沈み、液化が進んだ。また、4ヶ月目以降のもろみは上清が透明になり、6ヶ月目には十分に液化が進み、濾過適性に優れていた。

### 3. 窒素の定量

卵白もろみ上清の全窒素量は熟成前から高く 1.59 g/100ml で、発酵熟成期間中に少しずつ上昇し、6ヶ月目で 1.84 g/100ml となった。一方、ホルモール態窒素量は熟成当初、0.12 g/100ml を示したが、熟成の進行にともない増加し、熟成6ヶ月目で 0.93 g/100ml となった(図2)。これらの変化に伴い、ペプチド鎖平均鎖長は熟成前の 13.5 から、6ヶ月目には 1.98 まで低分子化された(図3)。

また、6ヶ月熟成後のもろみ上清のタンパク質量は、11.4g/100ml、市販濃口醤油は



商品記載資料より 9.3g/100ml であった。

#### 4 . pH の変化

熟成前の pH は 6.6 を示した。6 ヶ月間の熟成期間中、熟成にともない徐々に低下して、2 週間目で 6.5、4 週間目で 6.4、2 ヶ月目に 6.1、4 ヶ月目には 5.8、そして 6 ヶ月で 5.7 となった（図 3）。

#### 5 . 色調の変化

熟成前の色調は薄いものの、麹菌孢子の影響より、緑がかっているが、2 週目には、薄く黄色みをおびた液となった。2 ヶ月目以降、着色が進み、6 ヶ月目には薄い茶褐色を呈した（図 4）。

明るさを示す L\*値は、熟成前 68.4 であったが、2 週目、4 週目は濁りが出てきたため急激に低下した。4 ヶ月目に濁りがなくなり、L\*値は上昇した。熟成が進むにつれ、色が濃くなり 6 ヶ月目には 53.7 まで低下した。熟成前、a\*値は-20 であったが、熟成が進むにつれ値が上昇し 19.4 となり、赤みが強くなった。b\*値は熟成前、46.4 を示し、2 週目、4 週目で一度低くなったが、その後熟成が進むにつれ上昇し、6 か月目には 86.2 となり、黄みがかった色となった。

#### 6 . アミノ酸分析

##### 1) アミノ酸総量の変化

熟成前、アミノ酸総量は 0.37 g/100ml と低値を示したが、2 週間目に 1.04 g/100ml、2 ヶ月目に 3.90 g/100ml、4 ヶ月目には 7.75 g/100ml と直線的な増加を示し、その後、緩やかに増加を続け、6 ヶ月目には 8.01 g/100ml となった（図 3）。

##### 2) 各種アミノ酸含量

旨味に関するアスパラギン酸は、市販醤油の 0.63 g/100ml に対したまご醤油が 0.89 g/100ml、アスパラギン酸より強い旨味を持つグルタミン酸の濃度は、市販醤油の 1.2 g/100ml に対したまご醤油が約 1.6 g/100ml と高値を示した。さらに、たまご醤油では、甘味に関するグリシン、アラニン、苦味とコクに関するバリン、ロイシン、リジンなどが市販濃口しょうゆに比べて特に高値を示した（図 5）。

## 7．塩分の定量

6 ヶ月熟成後の卵白もろみの塩分は、16.1%を示したが、火入れ殺菌後のたまご醤油の試作品は 20.8%であった。また、市販濃口醤油は 16.0%であった。

## 8．水分含量

火入れ殺菌後のたまご醤油の試作品の水分含量は 64.8%, 市販濃口醤油 67.1%であった。

## 9．卵白タンパク質の定量

6 ヶ月発酵熟成後の卵白もろみ上清に残存する卵白タンパク質量は  $75 \mu\text{g/ml}$  であった。しかし、火入れ殺菌後により引きをして調製したたまご醤油中の卵白タンパク質量は、検出限界 ( $0.78\text{ng/ml}$ ) 以下を示した。

## 10．官能検査によるたまご醤油と市販醤油の比較

各設問に対して、たまご醤油と市販醤油のどちらがあてはまるか(好まれるか)をパネル 28 人に検査をおこなった。たまご醤油の評価は、②甘みを感じる(21 人)、③卵の味を感じる(25 人)、⑥色が薄い(26 人)、が 1%水準で有意差が認められ、①旨味が強い(20 人)、⑦おいしい(総合評価)(20 人)は 5%水準で有意差が認められた。また、⑤風味がよい(17 人)は有意差が認められなかった。④大豆の味を感じると回答したパネルも 6 人あった。

また、「だしがなくても十分おいしい」「だし味を感じる」「まろやかで優しい味がする」などの感想が得られた。一方、「あと味がしつこい」という意見も見られた。

## 第 4 節 考察

### 1．クラスト麴と通常の醤油麴の比較

ピザ台クラストは、焼成後の水分が約 40%と麴菌が生育する最適水分含量で、製麴時に水分を調整する必要が無く、たまご醤油を大量に調製する原料として非常に適していた。クラストに使用した活性グルテンは粘着力と弾力性を兼ね備え、水分を加えて混捏することにより粘弾性の組織を形成する。生地の発酵が進むと、イーストが炭酸ガスを発生し、グルテン組織間に保持され、生地を膨張させた。さらに焼成時には、ベーキ

ングパウダーの膨化作用も加わり、さらにきめの細かい気泡が形成され、熱変成して安定化した。この生地は、保水力があり、多孔質であるため、麹菌が旺盛に繁殖する条件が整っていた。

麹菌は成長過程において、多種多量の酵素を生成する。これらの酵素は原料の分解や麹特有の生産物の生成に対して重要な役割を果たす。特にプロテアーゼは 20 種類以上に及び、基質特異性や最適作用条件は様々であり、多種類のペプチド結合を分解することが可能となる。また、グルタミナーゼは遊離したグルタミンを分解してグルタミン酸を生成するが、不足するとグルタミンはピログルタミン酸に変換される。その結果、旨味の主体であるグルタミン酸が減少するため一定量以上のグルタミナーゼが必要である<sup>9)</sup>。クラスト麹は醤油麹の 2 倍以上の中性プロテアーゼ活性と、3 倍以上の酸性カルボキシペプチダーゼ活性、さらに約 2 倍のグルタミナーゼ活性が認められた (表 1)。

製麹中に炭酸カルシウムやリン酸ナトリウムを添加し、pH を微酸性から微アルカリ性に維持すると共に、栄養源を補給することによりプロテアーゼ生産性が高まるとの知見が示されているが<sup>10)</sup>、本研究で使用したベーキングパウダーにはリン酸塩が 17% 含まれており、麹の発育を促進し酵素活性の強化に影響したと思われる。また、原材料にグルテンを添加することにより、グルタミナーゼ生成が誘導され、高いグルタミナーゼ活性を得たと推測される。

## 2. 発酵熟成期間における卵白もろみの経時変化

卵白もろみの全窒素量は、熟成前から高い値を示し、大きな変動はないものの、徐々に分解が進んだ。これはクラスト麹に添加した卵白液中のタンパク質が水溶性であり、仕込み当初から卵白もろみ上清中に溶出して、全窒素量が高いためである。

ホルモール態窒素量は、熟成の進行にともない、直線的に増加するが、熟成 4 ヶ月以降、6 ヶ月までは緩やかに増加して約 1 g/100ml となり、順調に分解が進んだことを示している。一方、ペプチド鎖平均鎖長は、麹に添加した卵白に水溶性のたん白質が多く含まれているため、熟成前に高い値を示したが、熟成 4 ヶ月目以降には約 2.0 まで下がり、タンパク質の低分子化が進んだ。また、アミノ酸総量は 1 ヶ月あたり約 2 g/100ml 増加したが、4 ヶ月目以降は微量な増加に留まり、6 ヶ月目に 8.01 g/100ml を示した。すなわち、約 4 ヶ月間で、卵白もろみ中のタンパク質は、ほぼアミノ酸やペプチドに分解され、その後さらに分解が進み、可溶化した。

卵白のアレルゲン検査として、卵白タンパク質の定量を行った結果、卵白もろみの上

清（未殺菌たまご醤油）では  $75 \mu\text{g/ml}$  検出されたが、火入れ殺菌後、滓引きしたたまご醤油では不検出であった。このことは、6 ヶ月の発酵熟成後にわずかに残存した卵白タンパク質が火入れにより熱変成をおこし、不溶化し滓引きで除去され、アレルギーが消失したと推測される。

### 3. たまご醤油と市販の濃口醤油の比較

6 ヶ月熟成後のもろみ上清のタンパク質量は、市販濃口醤油の約 1.2 倍を示した。また、水分含量は、たまご醤油は市販濃口醤油より約 2% 低く高濃度であった。

食塩濃度は市販濃口醤油の 16.0% に対し、たまご醤油の試作品は 20.8% であった。卵白もろみは原材料全量に対して塩分 16% (W/W) に調製し、6 ヶ月熟成後のもろみの塩分も 16.1% であることより、濾過を行う際、残渣に対し、濾液に、より塩分が移行したと推測される。たまご醤油の最終的な塩分濃度を調整するためには、より詳細な配合条件の検討が必要である。

たまご醤油の、旨味に関するアスパラギン酸量は、市販濃口醤油に対し、約 1.4 倍、アスパラギン酸より強い旨味を持つグルタミン酸量は、約 1.3 倍の濃度を得た。また、甘味に関するグリシン、アラニン、苦味とコクに関するバリン、ロイシン、リジンも、高値を示した。この結果より、たまご醤油は市販濃口醤油とは異なった、特徴ある風味を持つと考えられる。クラスト麴の原材料には、活性グルテンおよび不活性グルテンを用いたが、グルテンを構成するアミノ酸の約 40% がグルタミン、グルタミン酸、およびピログルタミン酸からなる<sup>9)</sup>。これらのグルテンを原料の約 14% 配合したところ、高いグルタミン酸濃度のたまご醤油を得ることができた。

一般的な醤油の色はメイラード反応による非酵素的褐変と、チロシナーゼなどによる酵素的褐変で生成されるメラノイジンに起因する。醤油の着色は主にメイラード反応により起こるが、アミノ酸に反応する糖の量と種類に左右される。特にペントースはヘキソースに比べ、不安定なため褐変しやすい<sup>10)11)12)</sup>。

第五訂日本食品成分表記載の強力粉およびグルテン、小麦、脱脂大豆より算出したたまご醤油原料の糖含量は 17.4%、市販醤油原料の糖含量は 45.0% である。グルテンは大豆に比べてペントース含量が低いため、もろみ中のペントース含量も少なく、たまご醤油の色調が顕著に薄くなったと推測される<sup>9)</sup>。

官能検査による旨みや卵風味の比較では色の薄さ、卵の風味や旨味、甘み、総合的な「おいしさ」について有意差が認められ、たまご醤油は通常の市販醤油より高い評価を

得た。しかし風味に関しては、個人の嗜好の差により評価が分かれた。

本研究では、クラスト麴を高濃度食塩存在化で卵白液と 6 ヶ月間発酵熟成させることにより、アミノ酸総量が高く、特にグルタミン酸量が多いため旨味が強く、かつ甘味や卵風味を有し、色調が顕著に薄い高付加価値の発酵調味料「たまご醤油」が得られた。

今回、アミノ酸組成に注目して味の評価を行ったが、糖類および有機酸組成に関する検討も必要であると思われる。

また、卵のアレルゲンである卵白タンパク質は、6 ヶ月の発酵熟成中に麴菌の多様な酵素により分解され減少し、特に火入れ殺菌して調製したたまご醤油の最終試作品では、卵アレルゲン検査キットで検出限界以下となった。卵総タンパク質濃度は発酵前期に急激に減少し、24 週目で不検出となった。ELISA 法でのアレルゲン陽性とは、食品採取重量 1g あたりの特定原材料由来のタンパク質含量が 10  $\mu$ g 以上のものを指す。本試験で使用した「モリナガ FASPEK 卵測定キット (卵白アルブミン)」はスクリーニング法として厚生労働省に指定されており<sup>13)</sup>、その検出限界は 0.78ng/ml である。以上のことより、たまご醤油最終試作品の卵白タンパク質は低分子化され、アレルゲン性が消失したことが示唆された。このことより、クラスト麴と卵白液を用いたたまご醤油は、大量調製に適し、余剰卵白液の有効利用および高付加価値化に寄与すると共に、新規性のある発酵調味料としての利用が期待できる。

## 第 5 節 要約

パンにカビが生えやすい事に着目し、旨みの強いたまご醤油の調製を目的として、グルタミン酸の多い小麦グルテンと強力粉および酵母菌を捏ねてクラスト (ピザ台) 生地を調製した。麴菌の生育に最適な水分含量 (40-45%) になるよう焼成し、約 5mm 角に破碎したクラスト培地に、麴菌 *A. oryzae* を培養してクラスト麴を調製した。麴菌の菌糸が多孔質のクラスト培地内部にまで良く生育した。得られたクラスト麴は従来の醤油麴と比較し、中性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ、グルタミナーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ等の酵素活性が 2-3 倍も高値であった。

クラスト麴に食塩と卵白液を加え、卵白もろみ (塩分 16%) を調製し、室温で 6 ヶ月間の発酵熟成中、もろみ上清液の窒素定量やアミノ酸分析および卵白アレルゲンの検出を行った。全窒素量は、卵白のタンパク質が可溶性であるため、当初から 1.59% と高く、6 ヶ月で 1.84% となった。ホルモール態窒素量および総アミノ酸量は、それぞれ

当初の 0.12%および 0.37%が 6 ヶ月の熟成で 0.93%および 8.8%にまで上昇し、タンパク質が分解されて多量のアミノ酸が得られた。

最後に、熟成 6 ヶ月目のもろみを濾布ろ過後、火入れ殺菌して調製した卵白発酵調味液（たまご醤油）と市販の醤油を比較した結果、グルタミン酸濃度は 1.6%と市販の濃口醤油の約 1.3 倍も高値であった。また、官能検査の結果より、たまご醤油は、顕著に色調が薄く、旨みが強く、卵風味が感じられた。さらに、市販の卵アレルギー検査キットで測定した結果、卵タンパク質濃度は検出限界（0.78ng/ml）以下であった。



本研究では、窒素源として脱脂大豆の代わりに小麦グルテンを用い、小麦粉（強力粉）と捏ねて焼成したクラスト生地に着菌を高密度に培養することができた。そして、得られたクラスト麴と食塩と卵白液を混合し、16%食塩存在下、室温で 6 ヶ月間発酵熟成させ、市販の醤油より色調が薄く、旨みが強く、卵風味を有する新規な卵白発酵調味液（クラスト麴を用いた卵白分解型たまご醤油）を調製した。なお、このたまご醤油は、卵白アレルギーの原因タンパク質が検出限界以下まで十分に分解され、特定原材料（卵）表示の必要性はなかった。

## 引用文献

- 1) 吉沢淑, 醤油, 「醸造・発酵の事典」, 朝倉書店, 407-430(2002)
- 2) 荘 咲子, 深尾安規葉, 上野義栄, 八田 一, たまご醤油の調製に関する研究, 京都女子大学食物学会誌, 64, 34-41, (2010)
- 3) 鶏鳴新聞, (2011.10.05), <http://www.keimei.ne.jp/article/20111005t2.html> (2012, 09, 12)
- 4) 厚生労働省, 平成 23 年 鶏卵需給等関係資料 (2011)
- 5) 注解編集委員会編, 第四回改正国税庁所定分析法注解, (財) 日本醸造協会, 211-226 (1993)
- 6) しょうゆ試験法編集委員編, しょうゆ試験法, 財団法人日本醤油研究所, 19, (1985)
- 7) 日本薬学会編, 衛生試験法・注解 2005, 173-175, (2005)
- 8) 日本フードスペシャリスト協会編, 新版食品の官能評価・鑑別演習,
- 9) 岡田崇, 桂晴美, 古林万木夫, 醸協, 100, 478-483 (2005)
- 10) 枅倉辰六郎 編, 増補醤油の科学と技術, (財) 日本醸造協会, 171-181, 294-304, (1994)
- 11) 村上英也, 麴学, (財) 日本醸造協会, 259, 324, (2000)

12) 四方日出男, 醸協, 75, 149-155, (1980)

13) 小川正, 篠原和毅, 新本洋士, アレルギー食品の検出法, 「抗アレルギー食品開発  
ハンドブック」, SCIENCE FORUM, 263-264, (2006)

<p>名 称 発酵調味料</p> <p>原材料名 卵白、小麦、グルテン、食塩、イースト、ベーキングパウダー</p> <p>内 容 量 100ml</p> <p>賞味期限 2012年4月3日</p> <p>保存方法 直射日光を避け常温で保存</p> <p>製 造 者 京都女子大学 八田研究室 岡本醤油醸造場 岡本義弘 広島県豊田郡大崎上島東野2577</p> <p>京都府中小企業技術センター、株式会社菱六、京都女子大学八田研究室の共同研究で開発しました。</p> <p>特許出願中(特開2010-200702)</p>	 <p>〔試供品〕</p>	<p>本品はスポンジケーキの麹をつくり、卵白を発酵熟成した調味料です。</p> <p>開栓後はできるだけ冷蔵庫で保存し、賞味期限にかかわらず早めに使用してください。</p> <p> キャップ容器</p>
--	--	--

<p>名 称 発酵調味料</p> <p>原材料名 卵白、小麦、グルテン、食塩、イースト、ベーキングパウダー</p> <p>内 容 量 100ml</p> <p>賞味期限 2012年11月20日</p> <p>保存方法 直射日光を避け常温で保存</p> <p>製 造 者 京都女子大学 八田研究室 岡本醤油醸造場 岡本義弘 広島県豊田郡大崎上島東野2577</p>
---

京都府中小企業技術センター、株式会社菱六、京都女子大学八田研究室の共同研究で開発しました。

特許出願中(特開2010-200702)



図 1 たまご醤油の試供品ラベル



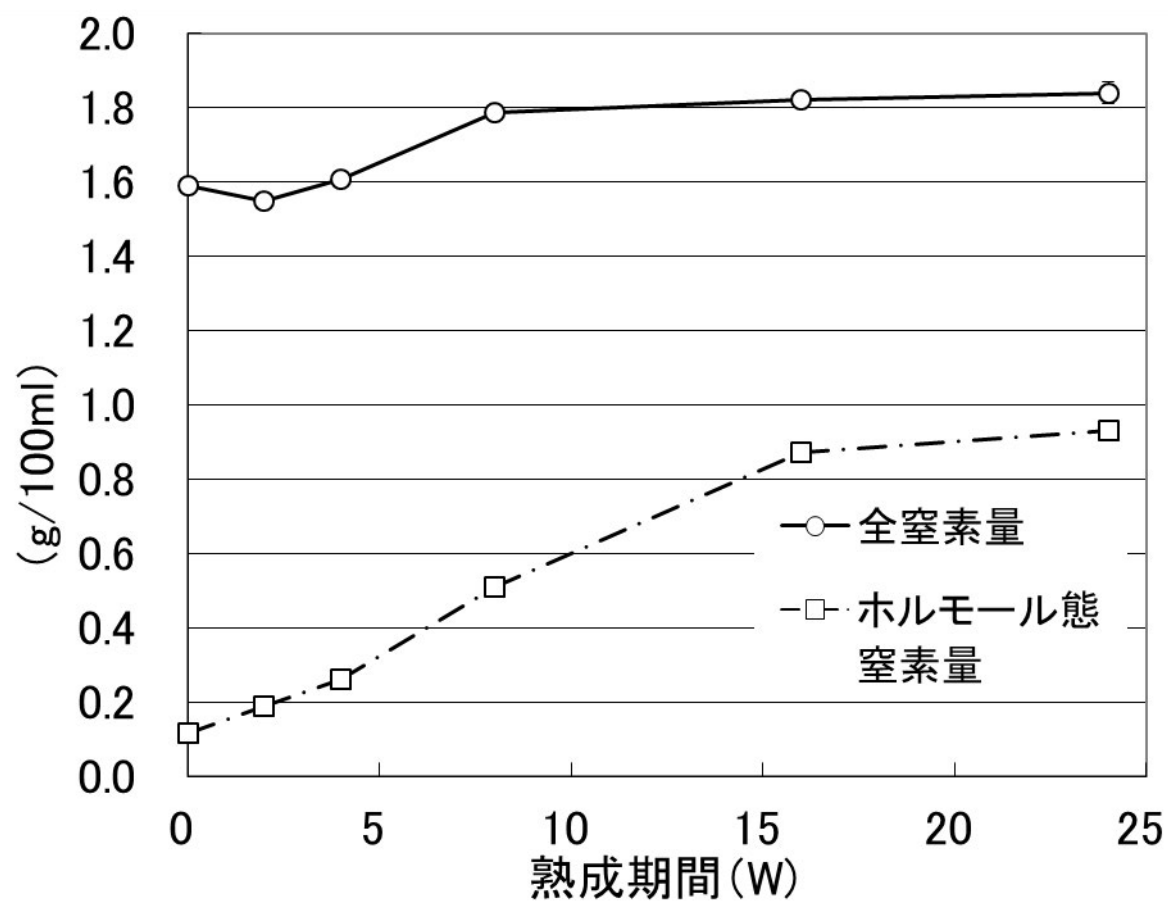


図2 もろみ上清中の全窒素量およびホルモール態窒素量の経時変化

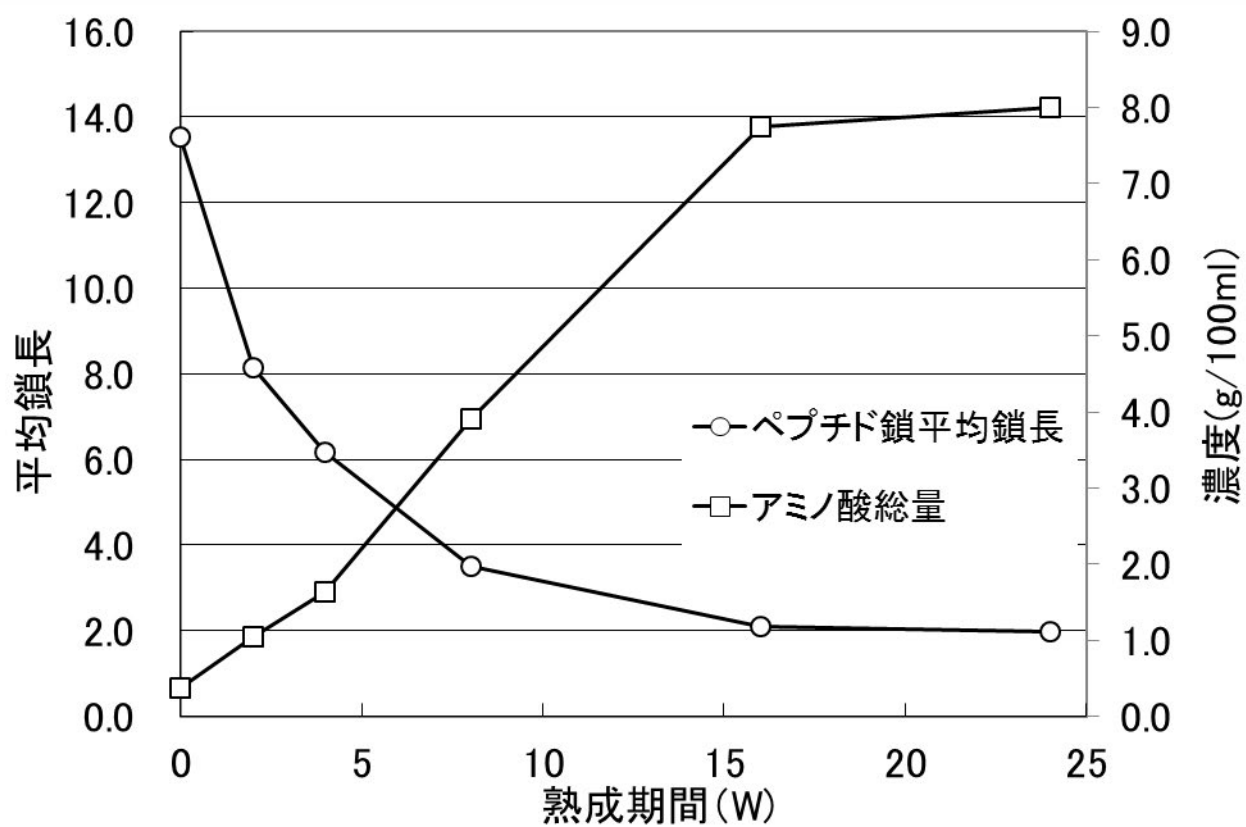


図3 もろみ上清中のペプチド鎖平均鎖長およびアミノ酸総量の経時変化



熟成期間	0週目	2週目	4週目	2ヶ月目	4ヶ月目	6ヶ月目
L*値	68.4	68.1	58.8	59.1	70.4	53.7
a*値	-0.2	0.2	1.6	2.9	4.9	19.4
b*値	46.4	41.4	40.6	51.4	86.7	86.2

図 4 たまご醤油の色調変化

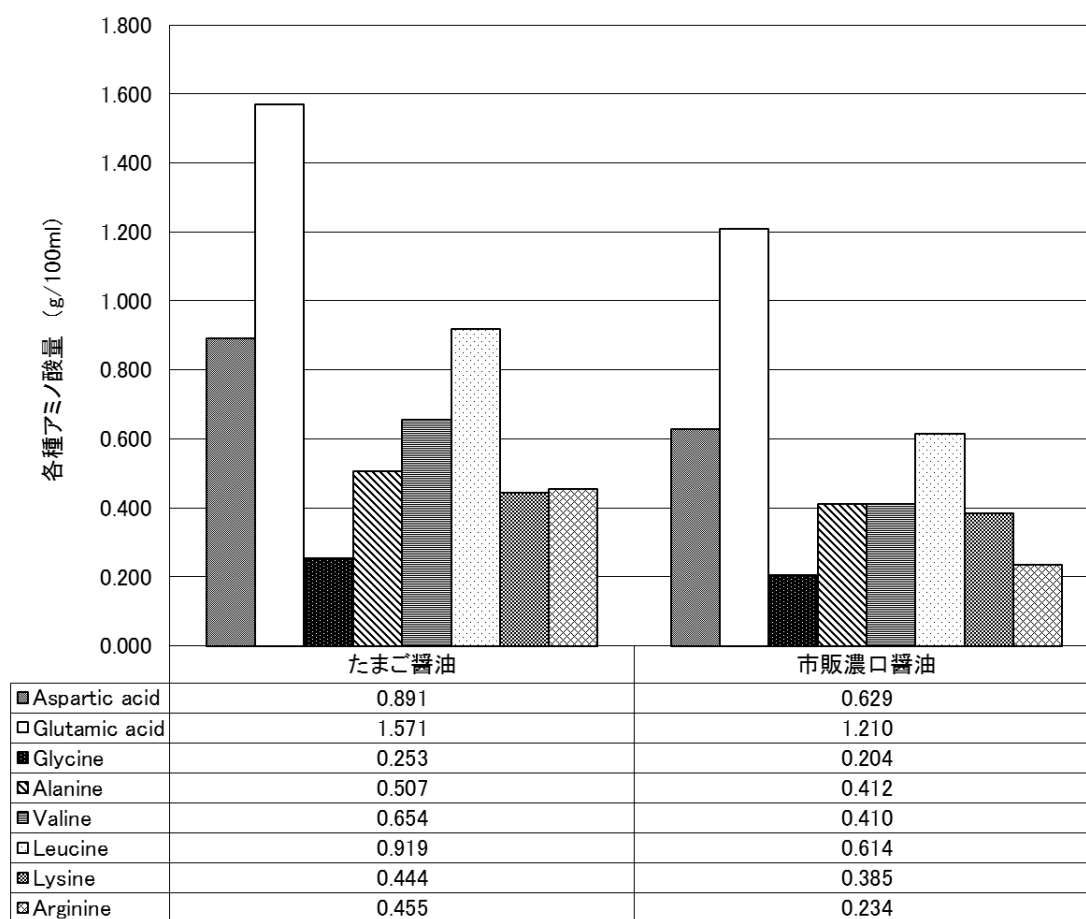


図 5 もろみ上清中のアミノ組成の比較

表 1 クラスト麴および対照麴の酵素活性値

(U/g)

	クラスト麴	醤油麴 (脱脂大豆+小麦)
中性プロテアーゼ	63,600±208	30,000±1150
酸性プロテアーゼ	25,800±180	23,000±74
酸性カルボキシペプチダーゼ	72,400±566	20,300±308
グルタミナーゼ	64.7±0	36.6±2.8
α-アミラーゼ	2,750±62	1,600±35
グルコアミラーゼ	860±6.0	400±5.0

平均値±標準偏差 (n=3)

### 3 章 卵白スポンジケーキにおける麹菌の高密度培養と 卵白発酵調味料(たまご醤油)の開発

### 3 章 卵白スポンジケーキにおける麹菌の高密度培養と

#### 卵白発酵調味料(たまご醤油)の開発

日本の鶏卵生産量は、2012 年の農林水産省鶏卵流通統計によると 251 万 t で、国民一人当たりの消費量は殻付き卵に換算して 324 個と世界トップクラスである。また、その内訳はパック卵として家庭で利用されるものと加工および業務用として消費されるものがそれぞれほぼ半数である<sup>1)</sup>。

従来、加工卵としてはマヨネーズや洋菓子に使用される卵黄の需要が多く、その消費量は増加傾向にある。一方、水産練り製品の需要低迷にともない卵白の消費量は低下し、現在多量の余剰卵白が冷凍保存されている。また、その冷凍保存コストは鶏卵加工業者の大きな負担であり、卵白の新しい用途開発が望まれている。

一方、醤油麹の調製は丸大豆の代わりに大豆油製造の副産物である脱脂大豆を用いるのが一般的であり、日常的に使われている醤油の約 80%が脱脂大豆を用いて生産されている。近年、食の多様化と高級化にともない、消費者志向として通常の醤油よりも丸大豆醤油が好まれている。また、魚介類を原料とした魚醤やカキ醤油など特徴的な風味を持つものや、色が淡いものが好まれ、味わいや料理の色を重視した調味料の需要が高まっている<sup>2)</sup>。さらに最近では、魚や畜肉などの動物性タンパク質を利用した発酵調味料の開発についても報告されている<sup>2~4)</sup>。

我々は余剰卵白の有効利用と付加価値の高い発酵調味料の調製を目的として、通常の醤油麹に食塩水の代わりに卵白液と食塩を混合した「もろみ」を発酵熟成させ、呈味成分の多い、従来にない卵風味や旨味を持つ卵白発酵調味料の調製に成功した<sup>5)</sup>。本研究では卵白の起泡性や泡沫安定性に着目し、麹の調製段階から大豆の代わりに卵白を利用したところ、卵白液と強力粉にベーキングパウダーを加えて焼成したスポンジケーキを固体培地として麹菌を培養する糸状菌高密度培養法を考案した。さらに、得られた「スポンジケーキ麹」に食塩と卵白液を加えて「卵白もろみ」とし、これを発酵熟成させる新規な卵白発酵調味液(たまご醤油)を調製して評価した。

なお、鶏卵は食物アレルギーの発症頻度が最も高い食品であり、小麦と同じく「特定原材料」として表示が義務化されている<sup>6)</sup>。しかし、醤油はその製造工程中に麹菌の多様なタンパク質分解酵素により、小麦や大豆のアレルゲンが分解消失されとの報告がある<sup>7~9)</sup>。本研究では「卵白もろみ」の発酵熟成中における卵タンパク質の消失についても検討した。

## 第1節 実験方法

### 1. 材料

#### 1) 卵白培地の材料

鶏卵は(株)ナカデ鶏卵(京都)より入手した白玉 S サイズを割卵し、卵白を分別採取して用いた。小麦粉として日清フラワー薄力粉(日清フーズ, 東京)を使用した。

#### 2) スポンジケーキ麴の材料

卵白液は三州食品(株)(愛知)の未濾過生卵白液を用いた。小麦粉として日清カメラリア強力粉(日清フーズ, 東京)を用いた。また、膨張剤としてベーキングパウダー(日清フーズ, 東京)を用いた。

#### 3) 醤油麴培地の材料

脱脂大豆は醸造用脱脂大豆(J・オイルミルズ, 東京)を、割砕小麦は醸造用割砕小麦(関司穀粉, 京都)を用いた。

#### 4) 種麴および試薬

種麴は(株)菱六(京都)のご厚意により提供された保存菌株 *Aspergillus oryzae* HO-117 を用いた。その他、試薬は特級グレードを用いた。

### 2. 卵白培地の調製

卵白液と薄力粉を用い、加工方法を変えてスポンジケーキ、卵焼き、ゆで卵の3種類の卵白培地(C/N 比=11.7)を調製した。

卵白液 450g をハンドミキサー(MK-210, 松下電器産業, 大阪)を用いて 10℃で 90 秒または 10 分間メレンゲ状に攪拌後、2 回篩別した薄力粉 150g をそれぞれのメレンゲの泡沫を崩さないように混合した。その混合物をアルミ製のトレイ(24cm×18cm×3cm)に入れ、ホイロ付きオーブン(THV, 戸倉商事, 滋賀)を用いて 160℃で焼成し、スポンジケーキ培地とした。また、卵白液 450 g と薄力粉 150g を均一に混合し、ホイロ付きオーブンで 160℃, 20 分間焼成し、卵焼き培地とした。さらに、卵白液 450 g と薄力粉 150g を均一に混合したものを、ポリエチレン袋(0.1mm 厚×205mm×300mm)に入れ熱電シーラーで密閉し、沸騰水中で 20 分間ボイルしたものをゆで卵培地とした。



各卵白培地を約 5mm 角に切断して乾燥させ、水分を 45%になるよう調湿した後、200mL 容メスシリンダーで容量(cm<sup>3</sup>)と重量(g)を測定し、それぞれの比容積(cm<sup>3</sup>/g)を算出した。

### 3. 各種麴の調製

#### 1) 卵白培地の材料

卵白液 450g と 2 回篩別した薄力粉および強力粉 150g を用い、前述のスポンジケーキ培地と同様の方法で調製を行った。なお、強力粉を用いた培地には、3.75g のベーキングパウダーを添加したベーキングパウダー添加培地と無添加培地の 2 種類を調製した(C/N 比=9.4)。また、比容積はほぼ均一になるよう調製した。対照として脱脂大豆と割砕小麦を重量比 1:1 で混合した通常の醤油麴培地(対照培地、C/N 比=9.1)を水分 45%に調湿した。

#### 2) 各種麴の培養

卵白培地と各種のスポンジケーキ培地、および対照培地をオートクレーブ滅菌用袋に封入し、121℃、20 分間オートクレーブで加熱処理した。40℃以下に放冷した各培地 500g に対し種麴を 1 g 接種し、電気定温恒温器(AM-180 型、芦田器械店、京都)で温度 30~33℃、湿度 95%以上の環境下で卵白培地は 48 時間、それ以外の培地は 69 時間培養を行った。

### 4 . 麴菌体量の測定

藤井らの方法<sup>10)</sup>に従い糸状菌細胞壁溶解酵素として Yatalase(タカラバイオ、滋賀)を用い菌体を溶解した。使用した。菌体溶解後の各試料溶液を 10 000rpm×10 分間遠心分離した上清 250 μ L にアセトニトリル 750 μ L を加え、メンブランフィルター用いて濾過し、高速液体クロマトグラフ LC-10 (島津製作所、京都)を用いて N-アセチルグルコサミン量(GlcNAc)の定量を行った。糖分析用カラム(Asahipak NH2P-504E 型 4.6mmID×250 mm, 昭和電工、東京)を用い、GlcNAc を 195nm で検出した。測定により得られた GlcNAc 量 139 μ g を乾燥麴菌体量 1mg として換算した。

### 5 . 酵素活性の測定

酵素活性測定に用いる各種麴の酵素抽出液は、麴 10 g に M/100 酢酸緩衝液(pH5.0)50 mL を加え、ホモジナイザー(ポリトロン PT2100S, セントラル科学貿易、東京)で 10 000rpm×2 分間攪拌した後、濾紙(No.2, アドバンテック東洋、東京)で自然濾過した。

濾過液 10 mL を 5℃以下で 1 晩、M/100 酢酸緩衝液(pH5.0)に対して透析した後、蒸留水を加えて 20mL とした。この酵素抽出液を適宜希釈し、各酵素活性測定に供した。

中性プロテアーゼ、酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼは国税庁所定分析法<sup>11)</sup>に準じて測定した。また、プロテアーゼ活性はミルクカゼインを基質として測定した。グルタミナーゼ活性は、しょうゆ試験法<sup>12)</sup>に準じ、ヤマサ L-グルタミン酸測定キット(ヤマサ醤油、千葉)を用いて測定した。

## 6. もろみの調製と発酵熟成

ベーキングパウダーを添加したスポンジケーキ培地を用いて調製した麴(スポンジ麴)1.7 kgに、もろみの塩分濃度が 16%になるように食塩 0.97 kgを混合した後、生卵白液(三州食品、愛知)3.4 kgを加えて卵白もろみとした。また、対照培地を用いて調製した対照麴 2.5 kgにもろみの塩分濃度が 16%になるよう、食塩 0.875 kgを混合した後、水 2.88 kgを加えて対照もろみとした。各もろみは、それぞれタンパク質含量が 12~13%になるよう調製した。もろみの仕込み当日から 1 週間は、1 日 1 回、その後は 1 週間に 1 回攪拌して均質化し、経時的にサンプリングを行いながら室温で 24 週間発酵熟成させた。

## 7. もろみ上清の分析方法

### 1) 試料の調製方法

熟成期間中の各もろみから、0 日目、2, 4, 8, 12, 16, 24 週間目に、それぞれ約 100g ずつサンプリングし、ガーゼで搾汁して液画分を分取した。さらに不溶物を除去するため、液画分の約 50mL を遠心分離機(Suprema21, トミー精工, 東京)で、12 000rpm×20 分、20℃で遠心分離した。これらの上清を濾紙 (NO.2, アドバンティック東洋, 東京)で自然濾過し、その清澄液を卵白もろみおよび対照もろみの上清試料とした。

### 2) 窒素の定量

全窒素の定量はケルダール分解法<sup>13)</sup>、ホルモール態窒素はしょうゆ試験法<sup>14)</sup>に基づいて行った。

タンパク分解率(%)は各もろみ上清試料中の全窒素量(TN)およびホルモール態窒素量(FN)から、 $FN/TN \times 100$  で算出した。

### 3) pH の測定

各もろみ上清の pH は pH メーター(PH BOY-KS723, 新電元工業, 東京)を用いて測定した。

### 4) 色調

各もろみ上清の色調を, 目視により経時的に採取した試料と比較した。

### 5) 塩分濃度の定量

仕込み時と 24 週間目のもろみ, および 24 週間熟成後のもろみ上清試料の塩分濃度をモール法で測定した<sup>15)</sup>。

### 6) アミノ酸分析

もろみ上清試料 0.5mL を 5 分間ボイルした後, 遠心分離機(KUBOTA1120, 久保田商事, 東京)を用いて, 14 000rpm×5 分間, 5°Cで遠心分離した上清をクエン酸三ナトリウム緩衝液(pH2.2)で 100 倍に希釈した。希釈液を再び 14 000rpm×5 分間, 遠心分離した上清 10  $\mu$  L を, 日立高速アミノ酸分析計 (L-8900 日立ハイテクノロジーズ, 東京)を用いて分析した。カラムは日立カスタムイオン交換樹脂 (4.6mmID×60 mm, 日立ハイテクノロジーズ, 東京) を用いた。

### 7) 卵白タンパク質の定量

卵総タンパク質およびオボムコイド濃度は卵白もろみの上清を適宜希釈し, サンドイッチ ELISA 法で測定した。卵総タンパク質は卵白アルブミン定量用の卵白アレルゲンモリナガ FASPEK 卵測定キット (森永生化学研究所, 神奈川)を用い, その操作マニュアルに従った。

また, オボムコイドは廣瀬らの方法に従い, 固相抗体に抗オボムコイド 7D, 二次抗体にビオチニル化抗オボムコイド 7D を用いた系で測定した<sup>16)</sup>。

## 第2節 結果

### 1. 卵白培地の作製法の違いと麹菌の増殖

麹菌の増殖に適した水分含量(45%)に調整した各種卵白培地の比容積( $\text{cm}^3/\text{g}$ )は、スポンジケーキ培地の泡立て時間に関わりなく高値を示し、卵焼き培地、ゆで卵培地の約3倍も多孔質であった(表3-1)。各培地のC/N比はいずれも11.7であり、それらに麹菌を培養した結果、特にスポンジケーキ培地には麹菌が高密度に増殖し、その内部にまで菌糸の伸張が観察された(図1)。

中性および酸性プロテアーゼ活性は、スポンジケーキ麹の泡立て10分と90秒ではほぼ同様であり、これは卵焼き麹の約2倍、ゆで卵麹の約3倍であった(表1)。

### 2. スポンジケーキ培地の条件検討

次に旨味の増強を目的として、グルテン含量の高い、すなわちグルタミン酸量の多い強力粉の使用を検討するため薄力粉使用の場合と比較した。薄力粉および強力粉を使用したスポンジケーキ培地の比容積は、それぞれ $6.0 \text{ cm}^3/\text{g}$ と $4.3 \text{ cm}^3/\text{g}$ であり、強力粉を用いると膨張しにくくなった。しかし酵素活性の比較では、薄力粉を使用した麹の中性および酸性プロテアーゼ活性はそれぞれ72 200U/g、34 700U/gであり、強力粉を使用した麹の場合、それぞれ77 400U/g、41 400U/gと強力粉が少し高い値を示した。

しかし、強力粉を用いたスポンジケーキではふくらみが悪かったため、強力粉にベーキングパウダーを加えて製麹したスポンジケーキ麹を調製し、対照麹に対して種々の酵素活性を比較したところ、測定を行ったすべての酵素についてスポンジケーキ麹の酵素活性が対照麹の約1.4~3.5倍と有意( $p<0.05$ )に高値を示した(表2)。また、このスポンジケーキ麹の麹菌体量は $28.6 \pm 3.1 \text{ mg/g}$  麹( $n=4$ )であり対照麹の $20.4 \pm 1.9 \text{ mg/g}$  麹( $n=4$ )の約1.4倍を示した、Mann-Whitney U検定を行った結果、このスポンジケーキ麹と対照麹の麹菌体量には有意差が認められた( $P<0.05$ )。これらの結果から、以降ではベーキングパウダーを添加したスポンジケーキ麹(スポンジ麹)を用い、卵白もろみを作製することにした。

### 3. 卵白もろみと通常の醤油もろみの比較

#### 1) 発酵状態

卵白もろみは仕込み当初、その表面にはスポンジ麹が浮上していたが、熟成とともに沈

み液化が進んだ。また、16 週間目以降のもろみは上清が透明になり、24 週間目には十分に液化が進み、濾過も問題なく行うことができた。一方、対照もろみは、熟成が進むとともに粘度が高まり、着色も進んだ。

## 2) 窒素の定量

発酵スタート時の各もろみ中のタンパク質量を確認するため未濾過のもろみ中の可溶化窒素の測定を行った。卵白もろみには可溶化窒素が  $2.04 \pm 0.12\%$ 、対照もろみには  $2.37 \pm 0.27\%$  含まれていた( $n=3$ )。これらをタンパク質量に換算すると、卵白もろみ 12.6%、対照もろみ 13.7%となり仕込み時の設定である約 13%とほぼ等しくなった。卵白もろみ中には卵白および小麦由来のタンパク質がそれぞれ約 11%と 2%含まれており、対照もろみには大豆および小麦由来のタンパク質が約 10%と 3%含まれていると考えられる。

卵白もろみ上清には、仕込み当初より可溶化窒素が 1.58%含まれ、時間経過とともに徐々に増加しながら、24 週間目には 2.04%に達した。対照もろみ上清の測定値は仕込み当初 0.31%と低値を示すが、2 週間で急速に分解が進み、その後 24 週間目には 1.51%まで分解が進んだ(表 3-3)。また、卵白もろみ上清中のホルモール態窒素量は、仕込み当初 0.10%、24 週間目には 1.37%と熟成の進行に伴い分解が進み増加した。一方、対照もろみ上清中では、仕込み当初 0.12%が 2 週間で急増するが、8 週間目以降は分解が遅くなり 24 週間目で 0.65%であった。卵白もろみ上清中のタンパク分解率は 24 週間目の熟成期間に 6.5%から 68.2%まで増加したが、対照もろみ上清は 34.0%から 43.2%と、大きな変化は見られなかった。

## 3) pH および色調の変化

仕込み当初、卵白もろみ上清の pH は 6.7 を示し、24 週間の熟成で 5.1 まで低下した。対照もろみは熟成期間中に pH5.9 から 4.9 まで低下した(表 3-3)。

卵白もろみ上清の色調は、仕込み当初より対照もろみに比べて顕著に薄く、16 週間目以降にわずかに着色が見られ、24 週間目に薄い茶褐色を呈した。対照もろみ上清は仕込み当初より茶褐色を呈しており、経時的に着色が進み、24 週間目には卵白もろみ上清に比べ、明らかに濃く着色した(図 2)。

## 4) 塩分濃度の定量

卵白もろみの塩分濃度は、仕込み時から 24 週間目まで、16.1%から 16.4%とほとんど変

化が無く、24 週間目のもろみ上清は 21.6%であった。また、対照もろみの塩分濃度も 16.0%から 16.5%とほとんど変化が無く、24 週間目のもろみ上清は 21.8%であった。

#### 5) アミノ酸総量の変化

卵白もろみ上清中のアミノ酸総量は、仕込み当初 0.39%と低値を示したが、熟成と共にもろみ中のタンパク質の分解が進み、24 週間目には 7.64%まで上昇した。一方、対照もろみ上清中のアミノ酸総量も仕込み当初 0.45%と低値を示し、2 週間目には急激に分解が進んだが、それ以降は分解が進まず、24 週間目で 4.64%に留まった(表 3)。

#### 6) アミノ酸組成の比較

熟成 24 週間目の卵白もろみ上清中の各種アミノ酸濃度は、対照もろみ上清と同等または上回った。特に強い旨味を持つグルタミン酸の濃度は 1.04%と高値を示し、対照もろみ上清の 0.70%を大きく上まわった( $p<0.05$ )。一方、アスパラギン酸は 0.44%と、対照もろみ上清の 0.40%と同等であった。また、甘味に関するアラニン、苦味やコク味に関するバリン、ロイシンはいずれも卵白もろみ上清が有意に高値を示した(表 4)。

#### 7) 卵白タンパク質量の変化

卵白もろみ上清の仕込み時の卵総タンパク質濃度は 162mg/mL であったが、8 週間で約 22%、16 週間で約 3%に減少し、24 週間で不検出(0.78ng/mL 以下)となった。本研究で使用した「モリナガ FASPEK 卵測定キット」はオボアルブミン量を指標に卵総タンパク質濃度を測定するものである。仕込み時 4.2mg/mL 存在したオボムコイドは卵総タンパク質(オボアルブミン)より分解耐性を示し、8 週間で約 43%、16 週間で約 16%までしか減少しなかったが、24 週間では不検出となった(図 3)。

### 第 3 節 考察

#### 1. 卵白を用いた麹菌の高密度培養

麹菌の培養に卵白を利用する予備試験として、卵白液と小麦粉を用いた卵焼き培地、ゆで卵培地、スポンジケーキ培地の 3 種類を検討した結果、スポンジケーキ培地で、比容積が約 3 倍、プロテアーゼ活性に関しては卵焼き麹の約 2 倍、ゆで卵麹の約 3 倍と良好な結果が得られた(図 1, 表 1)。これは比容積の高いスポンジケーキ培地は適度に

多孔質化しており、麴菌の菌糸が組織内部に旺盛に繁殖し、それに伴い酵素量が増加して高い酵素活性が得られた可能性がある。このことから、スポンジケーキ培地が麴菌の高密度培養に適することが明らかとなった。

次に麴の培地に強力粉の使用を検討したところ、グルテン含量の高い強力粉は卵白メレンゲと混合することにより高い粘弾性を生じ、焼成しても膨張しにくかった。そこで強力粉にベーキングパウダーを添加した結果、麴の発育が促進され、麴菌体量は対照麴の約 1.4 倍を示し、さらに中性および酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ、グルタミナーゼなどの酵素活性を顕著に高めることが可能となった(表 2)。

醤油の醸造には麴菌が産生する多種多量の酵素が原料の分解に対して重要な役割を果たす。特にプロテアーゼは 20 種類以上に及び、基質特異性や最適活性条件は各々異なっている。このため多種類のアミノ酸からなるペプチド結合を分解することが可能で、高分子のタンパク質を分解し、遊離アミノ酸やオリゴペプチドとして可溶化するのに極めて有効である。また、麴菌の酵素の中でもグルタミナーゼは、遊離したグルタミンを加水分解してグルタミン酸を生成するが、その量が不足するとグルタミンがピログルタミン酸に変換される。このためグルタミナーゼは旨味の増強と維持のために重要な役割を果たす<sup>17-20)</sup>。そこでグルタミン酸量の増加を目的として、グルテン含量の高い強力粉を用いてスポンジ麴を調製したところ、グルタミナーゼ活性は対照麴より約 1.4 倍高くなった。また、そのもろみ熟成後のグルタミン酸の濃度も 1.04%と、対照もろみ上清の 0.70%に比べて高値を示した。このためスポンジケーキ培地はグルタミン酸の生成にも大きく寄与することが期待できる。

以上の結果より、卵白と強力粉にベーキングパウダーを添加して焼成したスポンジケーキは、麴菌の高密度培養に適し、中性および酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ、グルタミナーゼなどの酵素活性が対照麴より 1.4~3.5 倍も高いスポンジ麴の調製が可能となった。このスポンジケーキ培地は従来にない基本培地として種々の麴菌を高密度培養できる可能性があり、麴菌由来の種々の有用物質の調製にも役立ち、発酵調味料のみならず、多岐に渡る活用が期待できる。

## 2. 卵白発酵調味料(たまご醤油)の調製

卵白もろみと対照もろみ中ではタンパク質の分解と可溶化が進み、全窒素量およびホルモール態窒素量は熟成とともに増加した。卵白もろみと対照もろみのタンパク質含量は約 13%とほぼ等しく設定されているが、卵白液の水溶性タンパク質含量が高いた

め、卵白もろみ上清中の全窒素量は、熟成前から高い値を示した。ホルモール態窒素量はタンパク質の分解程度の指標であるが、対照もろみは発酵熟成 4 週間目までの分解が早く、それ以降の分解は緩やかに進んだ。一方、卵白もろみでは 24 週間目まで経時的に分解が進んだ。この変化は各もろみ上清中のアミノ酸総量の変化とよく一致し、仕込み後 4 週間目までは対照もろみの分解が進んだが、それ以降は卵白もろみのアミノ酸総量が多くなり、対照もろみの約 1.7 倍となった(表 3)。これらの各もろみの分解状況の相違は、原材料の違い、使用した麴の酵素活性の差、および卵白もろみに添加した生卵白液に含まれる種々のプロテアーゼインヒビターの影響を受けているものと推測される。特筆すべきこととして、卵白もろみの発酵上清は旨味に関するグルタミン酸濃度が高く、これを試食してみたところ、対照麴を使用した醤油とは異なり、旨みが強く、特徴ある卵風味を有するものであった。

24 週間発酵熟成後の卵白もろみ上清の色調は、対照もろみと比較して、顕著に薄く鮮やかであった(図 2)。醤油の色はメイラード反応による非酵素的褐変と、チロシナーゼなどによる酵素的褐変で生成されるメラノイジンに起因する。醤油の着色は主にメイラード反応により起こるが、アミノ酸に反応する糖の量と種類に左右される。特にペントースはヘキソースに比べ、褐変しやすい<sup>21)22)</sup>。一般的な醤油は、主原料の一つである脱脂大豆のペントース含量が高いが、たまご醤油の原材料である卵白液と小麦粉にはペントース含量が少ない。本研究では大豆を使用しないことにより色調が顕著に薄くなったと推測される。

### 3. 卵白タンパク質アレルゲンの消失

アレルギー予防の観点から、卵を使った加工食品においては特定原材料表示が義務づけられている。厚生労働省の通知法として指定された定量法により卵タンパク質を定量し、食品採取重量 1g あたりの卵タンパク質含量が 10  $\mu\text{g}$  以上の場合は特定原材料として卵の使用を表示しなければならない<sup>23)</sup>。本研究で使用した「モリナガ FASPEK 卵測定キット」は消費者庁の指定する測定法の一つであり、オボアルブミンを定量して得られた結果を卵総タンパク質に換算して表示するもので、その検出限界は 0.78ng/mL である<sup>24)</sup>。本法による定量の結果、卵総タンパク質濃度はもろみの発酵前期に急激に減少し、24 週目で検出限界以下となった。しかしながら、オボアルブミンよりオボムコイドの方が卵アレルゲンとしての寄与が大きいとする報告がある<sup>16)25)26)</sup>。従って、本研究ではさらに安全性を確認するためにオボムコイドの定量を行った。オボムコイドはト



リブシンインビターとしても知られており、予想通り卵総タンパク質(オボアルブミン)より分解が遅かったが、それでも 24 週間目では検出限界以下まで分解された。今回用いたオボムコイドの定量法の検出限界は約 30ng/mL であるが、卵総タンパク質量への換算を考慮しても 1  $\mu$ g/mL にも及ばず、卵白アレルゲンは十分に分解されていることが示された。

以上の結果より、スポンジケーキ培地は麴菌の高密度培養に適し、強い酵素活性を有する麴の調製が可能となった。また、スポンジ麴と卵白液を食塩存在下で 24 週間発酵熟成させた卵白もろみは、旨味が強く、かつ甘味や卵風味を有し、色調が顕著に薄く、卵アレルゲンタンパク質も消失していた。今後、官能検査と合わせて発酵条件の詳細な検討を加えることにより、新規性のある卵白発酵調味料(たまご醤油)の調製が可能になると共に、麴の培地、もろみの双方に卵白を使用することにより、さらなる余剰卵白液の有効利用および高付加価値化に寄与することが期待できる。

#### 第 4 節 要約

余剰卵白液の有効利用および高付加価値化をめざして、卵白発酵調味料(たまご醤油)の開発を行った。卵白を泡立て、強力粉とベーキングパウダーを添加して調製したスポンジケーキ培地は多孔質で麴菌の生育に適しており、菌糸の増殖が培地の内部まで観察された。本培地では中性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ、グルタミナーゼ活性が対照麴より約 1.4~3.5 倍も高値であり、卵白スポンジケーキを用いた麴菌の高密度培養が可能であった。

このスポンジ麴に食塩と卵白液を加え、卵白もろみを調製し、室温で 24 週間発酵熟成させたところ、独特の卵風味と強い旨味と薄い色調を有する新規な卵白発酵調味料(たまご醤油)の調製が可能となった。

特定原材料表示通知法 ELISA では本液中に卵タンパク質を検出できなかった。また、プロテアーゼインヒビター活性を有し分解されにくいオボムコイドを ELISA で定量した結果、検出限界以下であった。

#### 引用文献

- 1) 農林水産省, 平成 24 年 鶏卵流通統計調査の結果(2013).
- 2) Uchida, M., Ou, J., Chen, B., Zhang, x., Chen, S.,

Funatu, Y., Kawasaki, K., Satomi, M. and Fukuda, Y., Effect of soy sauce koji and lactic acid bacteria on the fermentation of fish sauce from freshwater silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Fishers Science.*, 71 , 422-430 (2005).

3) Indoh, K., Nagata, S., Kanzaki, K., Shiiba, K. and Nishimura, T., Comparison of characteristics of fermented salmon fish sauce using wheat gluten koji with those using soy sauce koji. *Food Sci. Technol. Res.*, 12 , 206-212 (2006).

4) Trang, N, H., Shimada, K., Sekikawa, M., Ono, T. and Mikami, M., Fermentation of meat with koji and commercial enzymes, and properties of its extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 85, 1829-1837 (2005).

5) 莊咲子, 深尾安規葉, 上野義栄, 八田一, たまご醤油の調製に関する研究, 京都女子大学食物学会誌, 64, 34-41 (2010).

6) 厚生労働省医薬局食品保健部長, 食品衛生法施行規則の一部を改正する省令の施行について, 食安発第 0603001 号(2008).

7) 古林万木夫, 谷内昇一郎, 田辺創一, 醤油醸造における小麦アレルギーの分解機構, 日本醸造協会誌, 100, 96-101 (2005).

8) 橋本裕一郎, 吉田多恵子, 古林万木夫, 宮澤いづみ, 高畑能久, 森松文毅, 田辺創一, 谷内昇一郎, 醤油醸造における小麦アレルギーおよび大豆アレルギーの分解・除去機構の解明, 醤油の研究と技術, 31, 347-351 (2005).

9) Kobayashi, M., Immunological functions of soy sauce: hypoallergenicity and antiallergic activity of soy sauce. *Journal of Bioscience and Bioengineering.*, 100 , 144-51 (2005).

10) 藤井史子, 尾関健二, 神田晃敬, 浜地正昭, 布川弥太郎, 市販酵素剤を利用した麹菌体量簡易測定法, 日本醸造協会誌, 87, 757-759 (1992) .

11) 五味勝也, 211 固体こうじ, 「第四回改正国税庁所定分析法注解」, 初版, 注解編集委員会編 (日本醸造協会, 東京), pp.211-226 (1993).

12) 塚田陽二, 酵素試験法, 「しょうゆ試験法」, 初版, しょうゆ試験法編集委員会編 (日本醤油研究所, 東京), pp.305-310 (1985).

13) 別府正敏, 牛尾房雄, 岡野登志夫, 金谷健一郎, 佐野満昭, 平田芳明, 食品成分試験法, 「衛生試験法・注解 2005」, 2005 年版, 日本薬学会編(日本薬学会, 東京), pp.173-175 (2005).

14) 浜野光年, 岡安誠, しょうゆ分析法, 「しょうゆ試験法」, 初版, しょうゆ試験法

編集委員会編（日本醤油研究所，東京），pp.19-20 (1985).

15) 浜野光年，岡安誠，しょうゆ分析法，「しょうゆ試験法」，初版，しょうゆ試験法編集委員会編（日本醤油研究所，東京），pp.6-7 (1985).

16) Hirose, J., Kitabatake, N., Kimura, A. and Narita, H., Recognition of native and/or thermally induced denatured forms of the major food allergen, ovomucoid, by human IgE and mouse monoclonal IgG antibodies. *Biosci. Bioetchnol. Biochem.*, **68**, 2490-2497 (2004).

17) 枋倉辰六郎，中台忠信，酵素，「増補醤油の科学と技術」，初版，枋倉辰六郎編，（日本醸造協会，東京），pp.171- 183 (1994).

18) 中台忠信，醤油麴，「麴学」，第4版，村上英也編，（日本醸造協会，東京），pp.328-341 (2000).

19) 安井卓男，四方日出男，石上有造，しょう油こうじのグルタミナーゼⅢ全グルタミナーゼ活性の高い麴菌の検索と諸味中のグルタミン酸の溶出，醤油の研究と技術，**8**，117-122 (1982).

20) 中台忠信，やさしい醤油の技術No.178 醤油の味，醤油の研究と技術，**31**，360-372 (2005).

21) 加藤博通，橋場広長，褐変，「増補醤油の科学と技術」，初版，枋倉辰六郎編，（日本醸造協会，東京），pp.309-315 (1994).

22) 四方日出男，醸造飲食品と色-醤油の色-，日本醸造協会誌，**75**，149-155 (1980) .

23) Koppelman, S., Bruijnzeel-Kooman, C., Hessing, M. and Jongh, H., Heat-induced conformational change of *Ara h* I, a major peanut allergen do not affect its allergenic properties. *J. Biol. Chem.*, **274**, 4770-4777 (1999).

24) 小川正，篠原和毅，新本洋士，アレルギー食品の検出法，「抗アレルギー食品開発ハンドブック」，初版(SCIENCE FORUM，東京)，pp.263-264 (2006) .

25) Bernhisel-Broadbent, J., Dintzis, H. M., Dintzis, R. Z. and Sampson, H. A., Allergenicity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (*Gal d* III) compared with ovalbumin (*Gal d* I) in children with egg allergy and in mice. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* ., **93**, 1047-1059 (1994).

26) Urisu, A., Ando, H., Morita, Y., Wada, E., Yasaki, T., Yamada, K., Komada, K., Torii, S., Goto, M. and Wakamatsu, T., Allergic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* .,

100, 171-176 (1997).

引用 URL

i ) <https://www.soyssauce.or.jp/arekore/index.html> (2013.9.4)



ゆで卵培地



卵焼き培地



スポンジケーキ培地

図 1. 各種卵白培地における麴菌の外観

各卵白培地で麴菌を培養した後、それぞれを切断して内部を観察した。

卵白もろみ上清



対照もろみ上清




---

0 日目   2 週間目   4 週間目   8 週間目   16 週間目   24 週間目

図 2 もろみ上清の色調変化

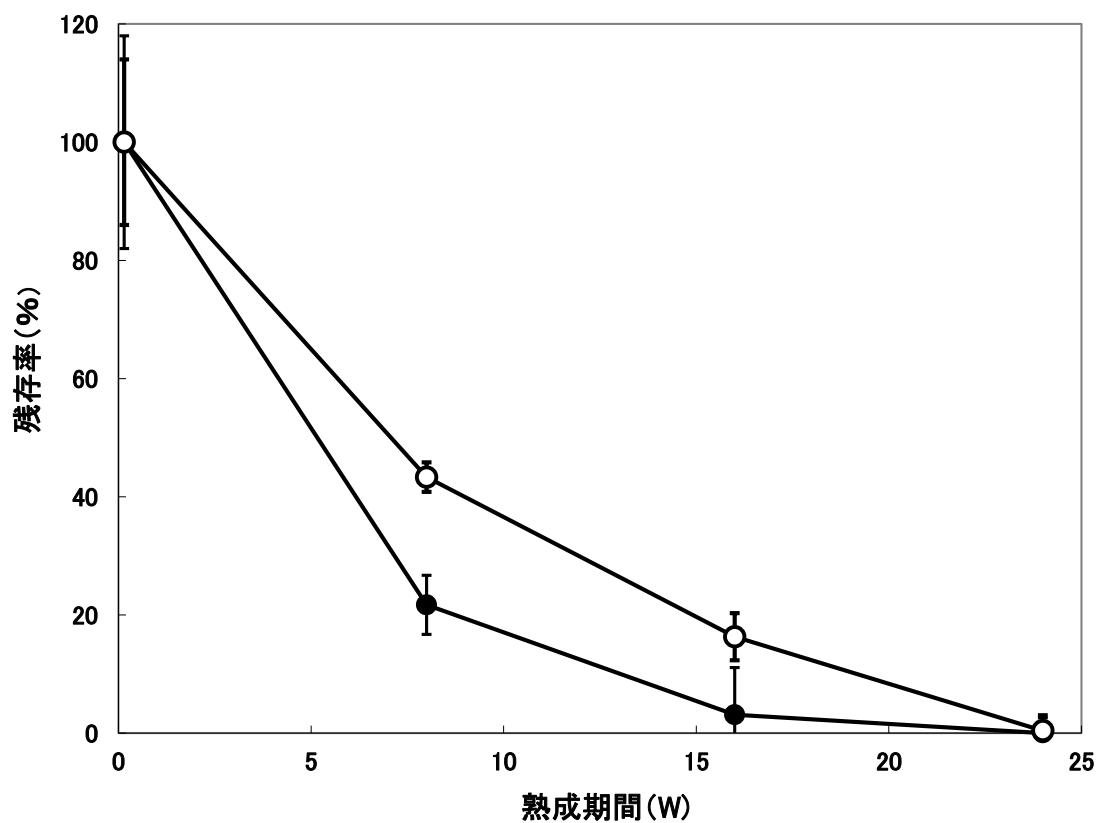


図3 卵白タンパク質の経時変化

●：卵総タンパク質，○：オボムコイド

オボアルブミンを指標とした卵総タンパク質およびオボムコイド濃度をサンドイッチ ELISA 法で測定した。

0 日目, 24 週目の定量値は 4 つの試料を用いて得られた結果の平均値±標準偏差で表した。

8 週目以降のタンパク質濃度は 0 日目の定量値を 100% として残存率で示した。

表 1 各種卵白培地麴のプロテアーゼ活性

	ゆで卵麴	卵焼き麴	スポンジケーキ麴 (泡立て 90sec)	スポンジケーキ麴 (泡立て 10min)
中性プロテアーゼ (U/g)	14 200	28 600	50 300	52 000
酸性プロテアーゼ (U/g)	7 000	13 500	23 500	24 600
比容積 (cm <sup>3</sup> /g)	1.8	2.1	6.0	6.1

比容積は水分 45%に調湿した各卵白培地の容量(cm<sup>3</sup>)と重量(g)から求めた。

表 2 スポンジ麴および対照麴の種々の酵素活性

	スポンジ麴	対照麴 (脱脂大豆+小麦)
中性プロテアーゼ (U/g)	90 800±5 290*	49 500±6 170
酸性プロテアーゼ (U/g)	48 800±2 760*	27 100± 700
酸性カルボキシペプチダーゼ (U/g)	55 900±5 450*	30 600± 609
グルタミナーゼ (U/g)	144± 24*	104± 10
α-アミラーゼ (U/g)	4 470± 420*	2 260± 159
グルコアミラーゼ (U/g)	1 810± 124*	511± 13

各酵素活性は 4 つの試料を用いて得られた結果の平均値±標準偏差で表した。

\* 対照麴に対して Mann-Whitny U 検定を行った結果、危険率 5%で有意差があったことを示す。

表 3 もろみ上清の経時変化

		0 日目	2 週間目	4 週間目	8 週間目	16 週間目	24 週間目
卵 白 も ろ み	全窒素量 (%)	1.58±0.14*	1.75	1.74	1.83	1.87	2.04± 0.29*
	ホルモール態窒素量 (%)	0.10±0.02	0.36	0.52	0.82	0.93	1.37± 0.27*
	タンパク分解率 (%)	6.5 ±1.5*	20.5	29.6	44.7	49.8	68.2 ± 16.2*
	遊離アミノ酸総量 (g/100mL)	0.39±0.06	0.64	0.90	1.59	4.84	7.64± 0.27*
	pH	6.7 ±0.13*	6.2	6.0	5.8	5.3	5.1 ± 0.08*
対 照 も ろ み	全窒素量 (%)	0.31±0.11	1.44	1.52	1.51	1.55	1.51± 0.06
	ホルモール態窒素量 (%)	0.12±0.05	0.55	0.60	0.64	0.67	0.65± 0.06
	タンパク分解率 (%)	34.0 ±9.7	37.8	39.5	42.6	43.3	43.2 ± 3.0
	遊離アミノ酸総量 (g/100mL)	0.45±0.11	2.98	3.90	4.38	4.77	4.64± 0.73
	pH	5.9 ±0.30	5.4	5.4	5.3	5.1	4.9 ± 0.08

タンパク分解率=ホルモール態窒素量 /全窒素量×100

遊離アミノ酸総量(g/100mL)：高速アミノ酸分析計を用いたアミノ酸分析値より計算.

0 日目, 24 週目の分析値は 4 つの試料を用いて得られた結果の平均値±標準偏差で表した.

\* 対照もろみに対して Mann-Whitney U 検定を行った結果, 危険率 5%で有意差があったことを示す.



表 4 卵白もろみおよび対照もろみ上清中の遊離アミノ酸濃度

	卵白もろみ	対照もろみ
Asp	0.44±0.05	0.40±0.09
Thr	0.35±0.02*	0.20±0.04
Ser	0.54±0.05*	0.27±0.05
Asn	0.13±0.07*	0.02±0.01
Glu	1.04±0.09*	0.70±0.15
Gln	0.09±0.05	0.04±0.01
Gly	0.24±0.02*	0.17±0.03
Ala	0.55±0.03*	0.25±0.05
Cys	0.04±0.03	0.01±0.01
val	0.62±0.02*	0.29±0.05
Met	0.31±0.06*	0.06±0.02
Ile	0.43±0.04*	0.27±0.04
Leu	0.69±0.15*	0.45±0.06
Tyr	0.13±0.04	0.12±0.02
Phe	0.47±0.07*	0.26±0.03
Gaba	0.01±0.01	0.01±0.01
His	0.14±0.01*	0.12±0.01
Lys	0.58±0.06*	0.35±0.06
Trp	0.06±0.04	0.00±0.00
Arg	0.38±0.15	0.37±0.05
Pro	0.41±0.06*	0.26±0.07
Total	7.64±0.27*	4.64±0.73

(g/100mL)

熟成 24 週間目の各もろみ(n=4)を用いて得られた結果の平均値±標準偏差で表した.

\* 対照もろみに対して Mann-Whitney U 検定を行った結果, 危険率 5%で有意差があったことを示す.

## 公表

### 第1章 卵液分解型たまご醤油の調製

莊咲子, 深尾安規葉, 上野義栄, 八田一, たまご醤油の調製に関する研究, 京都女子大学食物学会誌, 64, 34-41 (2010).

### 第2章 クラスト（ピザ）麴を用いた卵白分解型たまご醤油の調製

莊咲子, 上野義栄, 八田一, たまご醤油の調製に関する研究 第2報  
ーピザ台への麴菌培養と卵白液の醤油化ー, 京都女子大学食物学会誌,  
64, 34-41 (2010).

### 3章 卵白スポンジケーキにおける麴菌の高密度培養と卵白発酵調味料(たまご醤油)の開発

莊咲子, 上野義栄, 八田一, 成田宏史, 卵白スポンジケーキを用いた麴菌の  
高密度培養と卵白発酵調味料（たまご醤油）の開発, 日本食品科学工学会誌,  
(印刷中).

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜り、本論文をまとめるに際して、親身なご助言と励ましをいただきました京都女子大学 成田宏史教授、八田一教授に心から感謝申し上げます。

本研究の遂行に当たって、適切なるご指導ならびにご助言を承りました、京都女子大学 土居幸雄教授、京都府中小企業技術センター 上野義栄氏、大和学園京都栄養医療専門学校 山口友貴絵准教授、大阪成蹊短期大学 木津久美子専任講師に深謝申し上げます。

また、河村幸雄教授をはじめとする京都女子大学の先生方には数々のご指導と励ましをいただきましたことを深く感謝致します。

本研究における有益な議論と情報ならびに試料提供をしていただきました、株式会社菱六 菊島直氏、奥野製薬株式会社 田中克幸氏、株式会社ナカデ鶏卵の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に大学院生活において支えていただいた 畑ひろみ様、苦楽を共にした岡崎史子さん、高田名津美さん他、研究室の皆様、ご協力ありがとうございました。